

法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

トウガラシの辛味成分含有量と辛味が示す植物病原細菌抑制効果の検証

著者	渡辺 信平
著者別名	WATANABE Shimpei
ページ	1-55
発行年	2016-03-24
学位授与年月日	2016-03-24
学位名	修士(生命科学)
学位授与機関	法政大学 (Hosei University)
URL	http://hdl.handle.net/10114/12508

2015 年度 修士論文

論文題名 トウガラシの辛味成分含有量と
辛味が示す植物病原菌抑制効果の検証

指導教員 佐野俊夫

大学院理工学研究科
生命機能学専攻 修士課程

14R7205 氏名 わたなべ しんぺい 渡辺 信平

目次

1.	要約	2
2.	諸言	3
(1)	トウガラシの歴史と辛味成分	3
(2)	トウガラシの辛味に関する生理機能	6
(3)	カプサイシノイドの抗菌効果	7
3.	材料	9
(1)	トウガラシ (<i>Capsicum</i> spp)	9
(2)	植物病原菌類	10
4.	手法・結果	11
(1)	実験 1 開花後日数によるトウガラシに含まれるカプサイシノイド含有量 ..	11
(2)	実験 2 カプサイシノイド合成系遺伝子の開花後日数による発現量比較	27
(3)	実験 3 培地上でのカプサイシノイドが示す植物病原菌抑制効果の検証	33
(4)	実験 4 トウガラシ果実が示す植物病原菌抑制効果の検証	41
5.	結果（まとめ）	49
6.	考察	50
7.	今後の展望	51
8.	謝辞	52
9.	引用・参考文献	53

1. 要約

トウガラシ (*Capsicum* spp.) は果実に特有な風味と強力な辛味をもつ安価な香辛料として日本でもよく用いられている代表的な香辛料の一つである。その辛味を担うのはカプサイシノイドと呼ばれる物質群であり、強い抗菌性があると言われているため、食品として利用するのはもちろんのこと、食品保存や園芸分野など幅広い分野で利用されている。

本研究では、カプサイシノイドと組織や開花後日数(週齢)などの関係を明らかにし、辛いトウガラシ果実を判別できるようにするとともに、カプサイシノイドが植物病原菌にどのような効果を示すのかを検証し、辛味の強いトウガラシ果実を使った生物農薬などの植物防除に応用する可能性を探った。

開花後日数ごとに収穫したタカノツメの組織重量、カプサイシノイド含有量、辛味合成に関わるケトアシル合成酵素 (Ketoacyl synthase、*Kas*) 遺伝子の発現量変化を求め、開花後 30 日～40 日のトウガラシが辛いことが判明した。次にカプサイシノイドが持つ抗菌性を調べるため、培地とトウガラシ、ピーマンを使用し、植物病原菌の接種試験を行った。その結果、細菌に対する抗菌効果はほとんど確認することができなかったが、一部の真菌では、培地・トウガラシ果実で共に抗菌効果が確認することができた。

2. 諸言

(1) トウガラシの歴史と辛味成分

トウガラシの歴史とは

トウガラシの原産地は中南米と考えられておりコロンブスによってヨーロッパに初めて持ち込まれたとされる。栽培植物としての適応性が極めて高く栽培が容易であり生産性も優れていたことから、トウガラシはわずか 100 年あまりでヨーロッパから世界各地に広まり香辛料として使用されるようになった。

日本に入ってきた時期は諸説あり、16 世紀半ばに鉄砲とともにポルトガル人が伝えた、という説と、17 世紀はじめに豊臣秀吉の朝鮮出兵の際、日本に持ち帰った、とする説が有力である【1】。

トウガラシの辛味

トウガラシを使用する際、果実に含まれる辛味は重要な使用基準である。トウガラシの辛味を担うのはカプサイシノイドと呼ばれる物質群であり 5 つの同族体からなる。これらは、カプサイシン、ジヒドロカプサイシン、ノルジヒドロカプサイシン、ホモジヒドロカプサイシン、ホモカプサイシンである (図 1)。品種によって多少の差はあるが、トウガラシに含まれるカプサイシノイドのうち 60~70 %がカプサイシン、30~40 %がジヒドロカプサイシン、5~10 %がノルジヒドロカプサイシンで占められており、ホモジヒドロカプサイシン、ホモカプサイシンは少量含まれている【2】。系統や種によってこれらの含有比率が多少変わり、辛味の質が変わってくる【3】。しかしカプサイシンとジヒドロカプサイシンの含有比率は開花後日数や肥料及び施肥量によって変化はほとんどなく、両化合物は常に一定の比率で合成されている【4】。

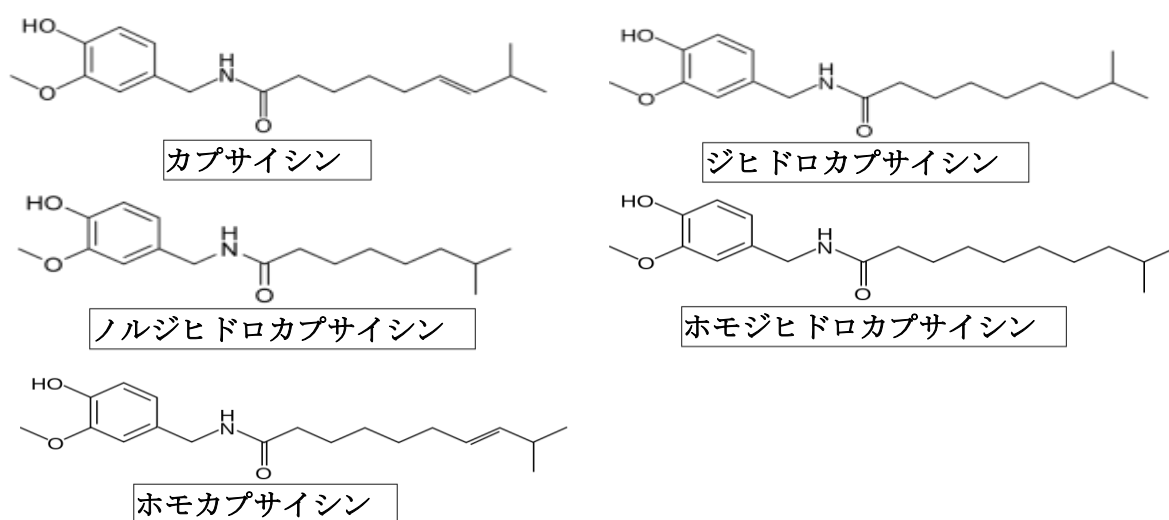


図 1. カプサイシノイドの構造式

トウガラシに含まれるカプサイシノイド 5 種類の構造を示した。

カプサイシノイド合成部位

トウガラシの辛味成分であるカプサイシノイドは長い間どの組織で合成されているか解明されていなかった。しかし現在ではカプサイシノイドは果実内部に種子が着生している胎座と呼ばれる組織（図 2）の柵状組織を構成する巨大表皮細胞で合成されることがわかっている【5】。カプサイシノイドは水にほとんど溶けない性質を持っているため、細胞外に放出され表皮細胞とクチクラ層の間に蓄積し、その後クチクラ層の崩壊に伴ってカプサイシノイドが果実内部に分散し果実全体が辛味を呈すると考えられている【2】。



図 2. トウガラシの断面図と各組織

カプサイシノイドの構造

カプサイシノイドはバニルアミンと炭素数の異なる飽和直鎖脂肪酸がアミド結合することによって出来る。カプサイシノイドの種類に関わらずバニルアミンの構造は変わらないが、分枝鎖脂肪酸の伸長の長さによって、カプサイシノイドの種類が決定される。トウガラシに含まれるカプサイシノイドはカプサイシン、ジヒドロカプサイシン、ノルジヒドロカプサイシン、ホモジヒドロカプサイシン、ホモカプサイシンである（図 1）。

カプサイシノイドの辛味の違い

トウガラシに含まれるカプサイシノイドのうち、その多くがカプサイシンとジヒドロカプサイシンである。それらの辛味の指標は一般的に辛味成分溶解物を被験者が辛味を感じなくなるまで砂糖水に溶かし、その倍率を表したスコヴィール値というもので表され、カプサイシンとジヒドロカプサイシンは辛みの強度は同じだが辛味の質が異なってくる。カプサイシンが多いとシャープな辛味となり、ジヒドロカプサイシンが多いと口の中で後まで残る辛味となる。またカプサイシンとジヒドロカプサイシン以外の化合物はこれら 2 つの化合物に比べ辛味の強度は弱く、種類によりその辛味の強度も変わってくる（表 1）。

表 1 トウガラシ中のカプサイシノイドの含有割合の範囲と辛み相対強度

(岩井和夫・渡辺達夫 編 トウガラシ 辛味の科学) より引用・改変【2】

主なカプサイシ ノイド	カプサイシン	ジヒドロカプ サイシン	ノルジヒドロ カプサイシン	ホモカプサイ シン	ホモジヒドロカプ サイシン
辛み相対強度	100	100	57	43	50

カプサイシノイドの抽出方法

トウガラシの辛味であるカプサイシノイドは疎水性化合物で、油に溶けやすい性質を持っている。またトウガラシの果実に含まれる水分は生の果実は 75 %、乾物では 8.8 %である【6】。そのため、カプサイシノイドを最大限に抽出するためには、天日乾燥や温風乾燥で、できるだけトウガラシを乾燥させ試料を細かく粉碎したのち、メタノール、エタノールなどのアルコール類、アセトン、アセトニトリル、ジエチルエーテル、酢酸エチル、クロロホルム、ジクロロメタンなどの中極性の有機溶媒が用いられる【2】。その中で最も抽出溶媒効率が良く約 3～24 時間で完全にカプサイシノイドが抽出され色素類の抽出量が少ないのがアセトンであるとされている【7】。

(2) トウガラシの辛味に関する生理機能

トウガラシの辛味受容体

人が感じる味覚のベースには五基本味とよばれるものがあり甘味、塩味、旨味、苦味、酸味という5つがある。この基本味とは別にトウガラシの辛みや渋みなどがある。

辛みを感じる理由として辛味物質群が人の痛覚や温覚などの味覚以外の感覚を刺激することによって辛味が起こるものと考えられてきたが、辛味の受容機構に関する解明はあまりされてこなかった。しかし最近の研究によりカプサイシンのレセプターが発見され、バニロイドレセプターVR1 (Vanilloid receptor-1) と名付けられた【8】。その後VR1はショウジョウバエの目の光受容に関する分子TRP (Transient Receptor Potential) と相同性を持つことからTRPV1と名付けられている【9】。また最近では辛味がレセプターによって受容されることによって、体内で様々な効果があることが最近の実験によって明らかにされてきた。

トウガラシの効果

トウガラシは調味料として辛味を楽しむことや食欲増進効果はもちろんのこと、生体内で様々な生理機能を発揮するといわれている。カプサイシンは一般的にダイエットに効果的だとして有名だが、それ以外にも体脂肪の燃焼や血行の促進、冷え症の予防改善など様々な働きを持っている(表2)。また調理して体内に摂取するだけでなく、古くから外用薬としても重宝されていた【10】。最近では、‘CH-19 甘’という品種のトウガラシから辛みを持たないカプサイシンの類縁体であるカプシノイドが発見され、‘CH-19 甘’を2週間摂取することにより、体重・体脂肪が減少することなどが確認されている【11】。このようにトウガラシ果実に含まれる健康成分には注目が集まっている。

表2 トウガラシに摂取することによって体に起こるとされる効果

株式会社わかさ生活 HP【10】より引用・改変

とうがらしの健康効果
◎ダイエット効果
◎高血圧を予防する効果
◎血行を促進する効果
◎食欲増進効果
◎リウマチを予防・改善する効果
◎発汗を促進する効果
◎免疫力を高める効果
◎疲労回復効果

(3) カプサイシノイドの抗菌効果

香辛料の抗菌効果

古くから私たちの身の回りにはスパイスやハーブなど様々な調味料があふれ、食生活豊かにしてきた。料理のアクセントとして使用することはもちろんだが、食品を保存する際にも非常に活躍してきたものである。食品を常温で保存する際に腐敗や変敗などしないよう、安全性を維持することはとても重要な課題であり、調味料に含まれる抗菌効果を利用し食品を長期保存することで人々の食生活を豊かにしてきた1つと言える。たとえば、マスタードやワサビなどの辛味成分であるアリルイソチオシアネート（Allyl isothiocyanate, AITC）や生姜の辛味成分であるショウガオール（Shogaol）は抗菌性があると言われている。しかしその物質によって抗菌性の強さが異なったり、特異性を持つため、未知の部分もある（表3）。

表3 酵母およびカビに対する香辛料精油と抽出物の抗菌性

岩井和夫・渡辺達夫 編 トウガラシ 辛味の科学 より引用・改変【2】

		酵母 <i>Debaryomyces hansenii</i>	出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	トルラ酵母 <i>Candida utilis</i>	真菌 <i>Trichoderma viride</i>	真菌 <i>Cephalosporium</i> sp.	真菌 <i>Aspergillus flavus</i>
精油	シナモン	+	3+	4+	3+	3+	3+
	オレガノ	4+	4+	4+	4+	4+	2+
	ピメント	4+	—	4+	4+	4+	±
	ローズマリー	3+	3+	3+	2+	2+	2+
	マスタード	5+	5+	5+	5+	5+	5+
	タイム	2+	—	2+	5+	5+	5+
抽出物	シナモン	4+	4+	4+	4+	4+	n.d
	ホワイトペッパー	2+	2+	3+	—	3+	n.d
	ブラックペッパー	4+	4+	4+	—	2+	n.d
	ピメント	4+	4+	2+	4+	4+	n.d

+5（最大効果）～+（効果あり） —（効果なし）

トウガラシの抗菌効果

香辛料のうちトウガラシにも抗菌効果があると言われ、いくつかの菌に対して抗菌効果が確認されている。特に食中毒に関する菌の研究が多くされていて、キダチトウガラシ (*Capsicum frutescens*) の粗搾汁液が大腸菌 (*Escherichia coli*) やサルモネラ菌 (*Salmonella typhi*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などに対して抗菌効果を示すことが発見されている【12】。またトウガラシの辛味成分であるカプサイシノイドにも抗菌性があることが報告されていて、食中毒の原因であるセレウス菌 (*Bacillus cereus*) や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などの細菌はもちろんのこと、食品などに用いられて馴染みのある出芽酵母の一種である *Zygosaccharomyces* 属やマイコプラズマの一種である *Mycoplasma agalactiae* などの真菌に対しても抗菌性が確認されている【2】。植物病原菌に対してもいくつかの菌に対して抗菌効果を示すことが知られており、辛くないトウガラシの種子に比べ辛味を持つトウガラシの種子は *Fusarium* 属菌に対する感染率が低下するなどの知見も確認されている【13】。

これらの知見をふまえ、本研究ではカプサイシノイドと組織や開花後日数などの関係を明らかにし、辛いトウガラシを判別できるようにするとともに、カプサイシノイドが植物病原菌にどのような効果を示すのかを検証し、辛味の強いトウガラシを使った生物農薬などの植物防除に応用する可能性を探ることとした。

実験1として辛味の強いトウガラシ果実を判別するため、開花後日数ごとのトウガラシ組織に含まれるカプサイシノイド含有量を求めた。その結果、開花後40日と90日のトウガラシに辛味成分が多く含まれることが判明したため、この事を検証するために実験2を行った。

実験2では、辛味成分の合成に関わる遺伝子の発現量比を測定することで、どの時期にカプサイシノイドが合成されているのかを検証した。

実験1と実験2の結果より辛味の強いトウガラシが判明したため、これらのトウガラシ果実を使用しカプサイシノイドが示す抗菌効果を検証することとした。

実験3ではカプサイシノイドを使った培地にて真菌・細菌に対するカプサイシノイドの抗菌効果を検証した。

実験4では培地だけでなく実際にトウガラシに植物病原菌を接種することでトウガラシ果実における抗菌効果を検証した。

3. 材料

(1) トウガラシ (*Capsicum* spp)

研究に使用するトウガラシとして市販されているものの中から 2 品種を選んだ。それぞれの品種の特徴を以下に示す。

・タカノツメ (*Capsicum annuum*) (つる新種苗)



原産地：熱帯アメリカ

辛みは極めて強く、果実を乾燥して香辛料として使い勝手がよい代表品種。生育旺盛で栽培容易で、長さ 3~4 cm 位の小型の果実が房状に結実する。

・ハバネロレッド (*Capsicum chinense*) (つる新種苗)



カリブ海沿岸の世界一辛いといわれるトウガラシ。激しい辛味と独特の風味を持つ長さ 3 cm 位で丸型~短太型の唐辛子。

(解説はつる新 種苗 HP より引用・改変)【14】。

(2) 植物病原菌類

トウガラシの抗菌効果を検証するにあたり、細菌を 4 種類、真菌を 5 種類使用した。使用した菌類については以下に示す。

・細菌類

- ① *Xanthomonas citri*
- ② *Pectobacterium carotovorum*
- ③ *Pseudomonas syringae*
- ④ *Curtobacterium flaccumfaciens*

・真菌類

- ① *Botrytis cinerea*
- ② *Colletotrichum gloeosporioides*
- ③ *Phytophthora capsici*
- ④ *Pythium splendens*
- ⑤ *Verticillium dahliae*

植物病原菌類を選ぶにあたり、原色野菜病虫害百科【15】を利用した結果、細菌では②*Pectobacterium carotovorum*（ピーマン軟腐病）、真菌では①*Botrytis cinerea*（ピーマン灰色かび病）、②*Colletotrichum gloeosporioides*（ピーマン炭疽症病）、③*Phytophthora capsici*（ピーマン疫病）、⑤*Verticillium dahliae*（ピーマン半身萎凋病）がトウガラシに感染することが確認されていた。

4. 手法・結果

(1) 実験1 開花後日数によるトウガラシに含まれるカプサイシノイド含有量

目的

トウガラシは果実ごとに辛みが異なることが経験的に知られているが、果実の成長と辛味との関係は明らかではないため、果実の成長変化とカプサイシノイド含有量との関係を追跡し辛いトウガラシを判別できるようにした。

材料

- ・タカノツメ (*Capsicum annuum*)
- ・ハバネロレッド (*Capsicum chinense*)

手法

2014年、2015年ともに4月上旬にタカノツメ・ハバネロのタネをそれぞれポットに20粒(5×4)を撒き、水をいれた白トレイにポットを浸しインキュベーターで一日置いた。その後温室で2週間育てた。2週間後に10cmポットで育てたトウガラシのうち育ちの良いトウガラシを5本選び、1本ずつセルトレイに移し再び温室で育てた。3週間程度温室で育てた後、大きく育ったトウガラシを大きめの鉢に移し替え温室からビニールハウスに移し育てた。苗が曲がっているものにはプラスチック棒に針金で苗を固定し真っすぐに育つようにした。ビニールハウスに移動したトウガラシを一週間ごとに観察に行き、花が咲いたら開花した花ごとにビニールテープで目印をつけた。1週間ごとにビニールテープの色を変えることで開花後日数ごとにグループ分けした。

6月中旬ごろから開花し果実が付いてきたので収穫した。収穫する際、収穫したことが残った果実に影響を及ぼすことを防ぎ、様々な開花後日数の果実を収穫できるようにするため、1鉢ずつ2週間ずつ収穫日をずらして収穫した。

収穫したトウガラシはその日のうちに個々の果実の生重量を測定後、果肉、胎座、種子に分け、各重量及び種子の個数を記録し、液体窒素で凍結し-30℃で冷凍保存した。

トウガラシのカプサイシノイドを抽出・濾過するため、冷凍庫で保存していたトウガラシ果実の各組織(胎座、果肉、種子)をバイアルビンに入れエタノール2mLに懸濁し、1時間超音波破碎してカプサイシノイドを抽出した。抽出したエタノールをHPLC用バイアルビンに移す際、フィルターを付けた注射器を使用することで不純物を濾過した。

カプサイシノイドとして一般的なトウガラシ果実に含まれる辛味成分の80~90%を占めるカプサイシン(capsaicin: Cap)とジヒドロカプサイシン(dihydrocapsaicin: diHCap)の濃度をHPLCにより測定した。HPLCの分析条件は以下の通りである。

HPLC 分析条件

カラム：HITACHI LACHROMULTRA C18 5 mm

展開溶媒：1 % 酢酸水溶液/アセトニトリル=50/50 (v/v)

注入量：5 μ L、流速：1.2 mL/min、

温度：40 $^{\circ}$ C、波長：280 nm

収集時間：15 分

HPLC 測定方法

カプサイシンとジヒドロカプサイシンの検量線を作成し HPLC にて分析した。検量線のクロマトグラムとトウガラシのクロマトグラムを比較することによりカプサイシンとジヒドロカプサイシンの検出時間（リテンションタイム）を求めた（図 3）。その結果、カプサイシンのリテンションタイムが 7m10s、ジヒドロカプサイシンのリテンションタイムが 10m10s になり、この時間をもとに組織での抽出液の成分判断に利用した。また検量線の面積値を測定することによりカプサイシノイド濃度に対する面積値の関係がわかるように収穫したトウガラシのカプサイシノイド濃度をもとめられるようにした。

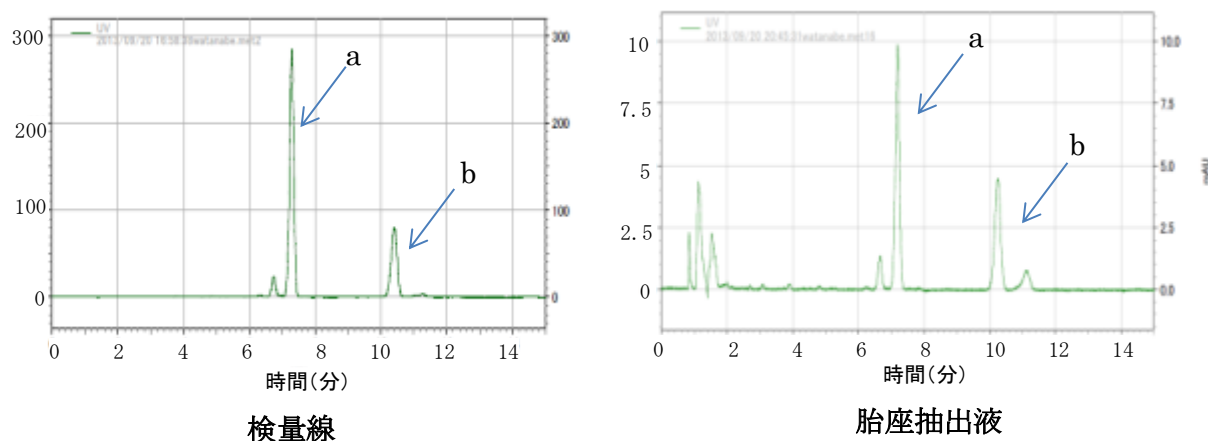


図 3：HPLC によるカプサイシノイドのクロマトグラム

HPLC にてカプサイシノイド粉末の検量線と実際にタカノツメの胎座抽出液を測定したもののクロマトグラムを示す。

a:カプサイシン (Cap)

b: ジヒドロカプサイシン (diHCap)

リテンションタイム (Rt)

カプサイシン 7m10s

ジヒドロカプサイシン 10m10s

結果

実験 1 ①開花後日数によるタカノツメ果実生重量変化

トウガラシ果実に含まれる辛味成分含有量の開花後日数による変化を観察するにあたり、トウガラシ果実の辛味と形態は大きくかかわってくるのではないかと考えた。そこで収穫時に果実の生重量を測定し開花後日数ごとの変化を分析した。

収穫したタカノツメを観察してみたところ、開花後日数増加とともに果実が大きくなるが、ある一定以上の大きさになると、開花後日数が経つにつれ水分が抜けて縮小していくように感じた（図 4）。タカノツメ生重量を測定してみたところ、2014 年、2015 年ともに開花後 30～50 日まで果実生重量が増加していくがそれ以降は減少するような結果となった（図 5、図 6）。2015 年度は 40 日頃に生重量が減少するなど、2014 年度に比べてグラフにバラつきが出たが理由については不明である（図 6）。



図 4. 開花後日数によるタカノツメ果実写真

2015 年における開花後日数によるタカノツメ果実の写真。

収穫したタカノツメの開花後 10 日、開花後 40 日、開花後 70 日、開花後 90 日の果実を収穫直後に撮影した。

スケールバーは 1cm を示す。

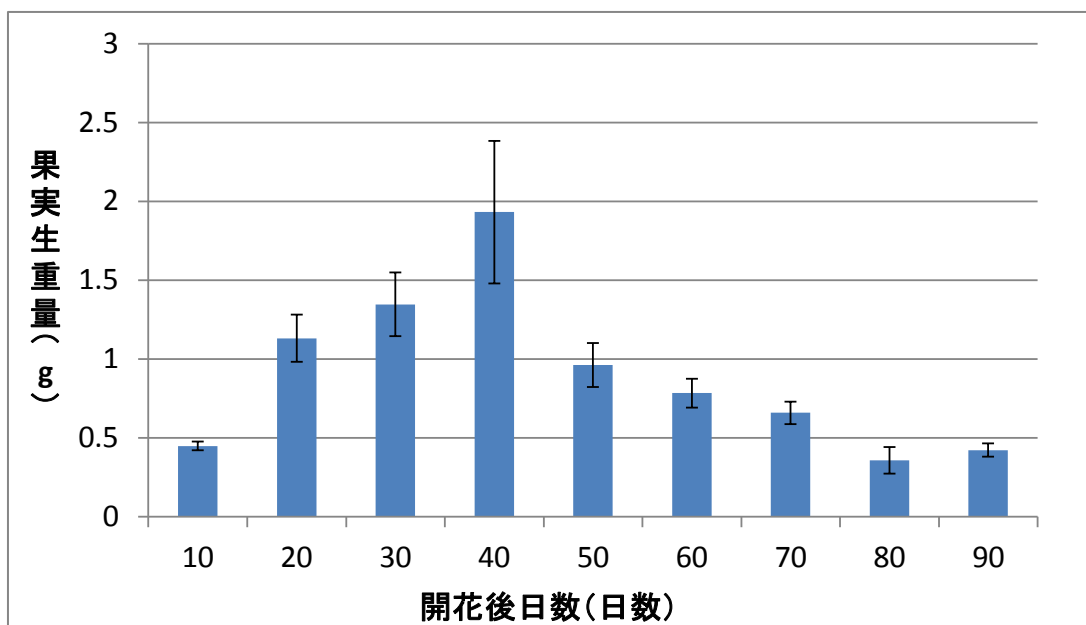


図 5. 開花後日数によるタカノツメ果実生重量変化「2014 年」

2014 年における開花後日数ごとの果実生重量変化を表す。

収穫したタカノツメの果実生重量を週齢ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 3～22 回の平均と標準誤差を示す。

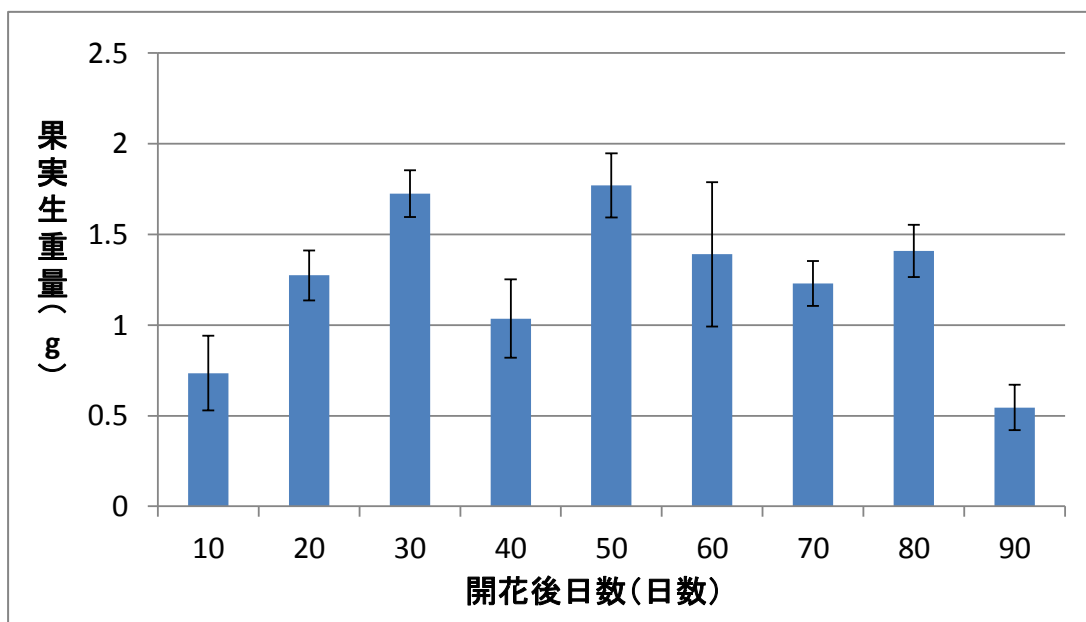


図 6. 開花後日数によるタカノツメ果実生重量変化「2015 年」

2015 年における開花後日数ごとの果実生重量変化を表す。

収穫したタカノツメの果実生重量を週齢ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 2～17 回の平均と標準誤差を示す。

実験 1 ②開花後日数によるタカノツメ胎座生重量変化

胎座組織はトウガラシの辛味が決定される上で重要な組織であるため、胎座組織の開花後日数による形態的变化を観察することはトウガラシの辛味を分析する上で重要であると考えた。そこで収穫時に胎座組織の生重量を測定し開花後日数ごとの変化を分析した。

収穫したタカノツメを分解して観察してみたところ、2014 年、2015 年ともに開花後 40～50 日まで胎座生重量が増加していくがそれ以降は減少するような結果となった（図 7、図 8）。胎座生重量が最大値になって以降、開花後日数が経つにつれ水分が抜けて縮小していくように感じた。2015 年度の開花後日数 60 日に胎座生重量が極端に減少している理由については不明である（図 8）。

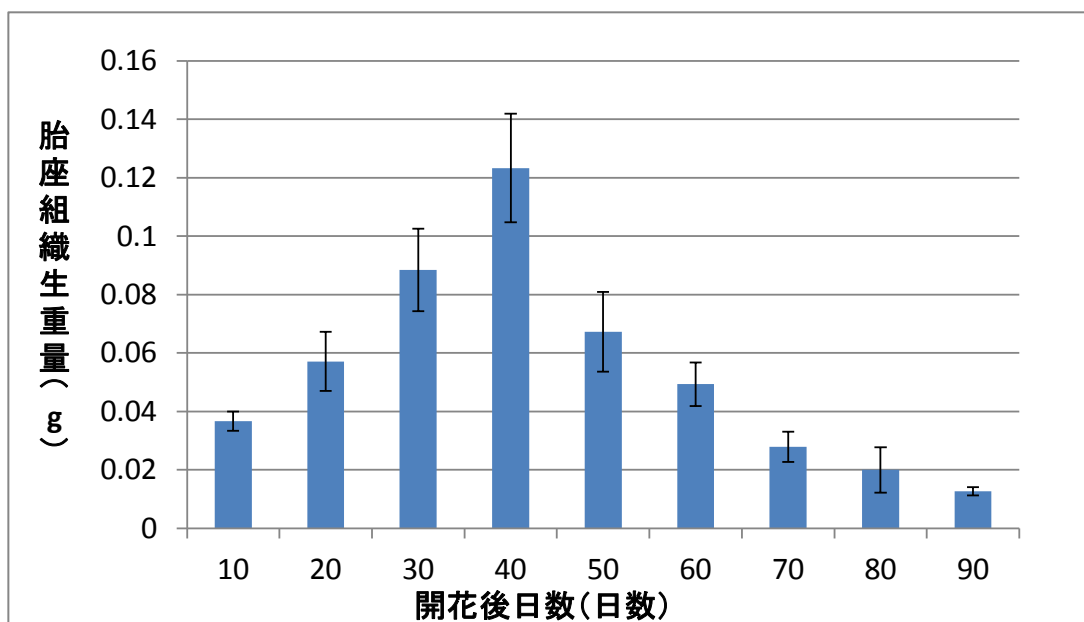


図 7. 開花後日数によるタカノツメ胎座生重量変化「2014 年」

2014 年における開花後日数ごとの胎座生重量変化を表す。

収穫したタカノツメを胎座・果肉・種子に分解したもののうち、胎座生重量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 3～22 回の平均と標準誤差を示す。

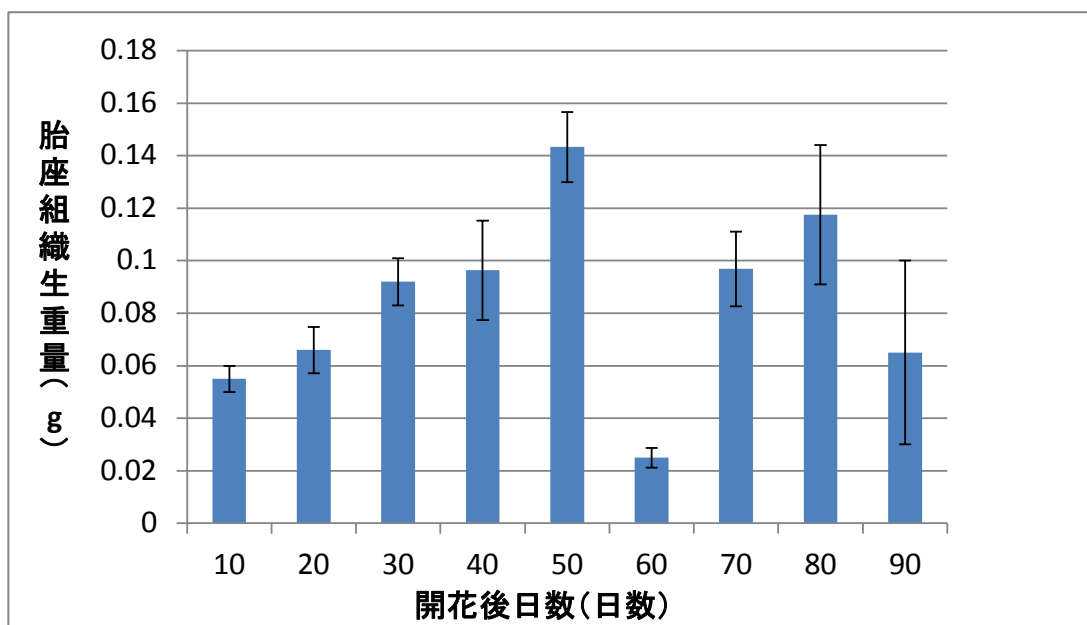


図 8. 開花後日数によるタカノツメ胎座生重量変化「2015 年」

2015 年における開花後日数ごとの胎座生重量変化を表す。

収穫したタカノツメを胎座・果肉・種子に分解したもののうち、胎座生重量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 2～17 回の平均と標準誤差を示す。

実験 1 ③開花後日数によるタカノツメ総カプサイシノイド含有量の変化

トウガラシとその辛味との関係を理解する上で、各組織でのカプサイシノイド含有量と開花後日数の関係を把握することが重要であると考えた。そこでトウガラシ果実 1 本あたりのカプサイシノイド含有量を求めると同時に、カプサイシノイドを合成していると思われる胎座組織と合成していない果肉と種子におけるカプサイシノイド含有量が開花後日数によってどのような変化をするのか分析した。

タカノツメ果実 1 本あたりの総カプサイシノイド含有量を求めたところ、開花後 40 日までは開花後日数増加にともないカプサイシノイド含有量は増加しそれ以降は減少した（図 9）。2015 年度の結果でも同様の傾向があり、開花後日数 30 日まではカプサイシノイド含有量は増加しそれ以降は減少した（図 10）。しかし、どちらの年数でも開花後 90 日の果実においてカプサイシノイド含有量が極端に増加した（図 9、図 10）。そこでカプサイシノイドを合成する胎座組織とカプサイシノイドを合成しない果肉＋種子とに分けてカプサイシノイド含有量の変化を分析した。

胎座でのカプサイシノイド含有量は総カプサイシノイド含有量と同様の傾向を示し、2014 年、2015 年とも 30～40 日まで開花後日数とともに増え、それ以降は減少するが、90 日で再び増加するという結果になった（図 11、図 12）。一方、果肉＋種子カプサイシノイド含有量は 2014 年と 2015 年度は異なる傾向になった。2014 年度では、開花後日数増加とともに果肉＋種子カプサイシノイド含有量は増加していったが、2015 年度では胎座カプサイシノイド含有量と同様に、開花後 40 日までは果肉＋種子カプサイシノイド含有量が増加していき、それ以降は減少した（図 11、図 12）。

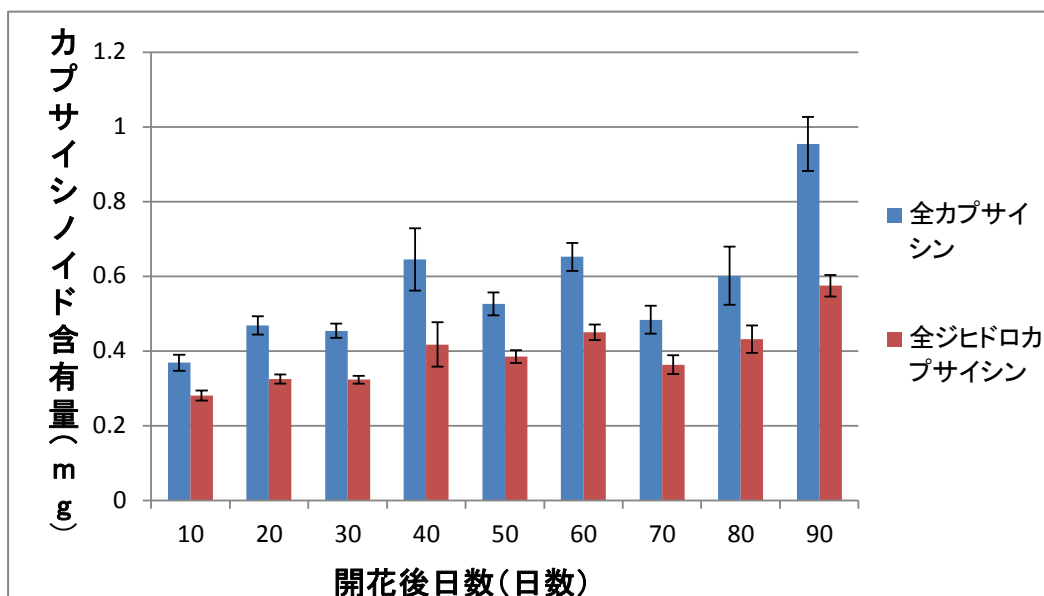


図 9. 開花後日数によるタカノツメ総カプサイシノイド含有量「2014 年」

2014 年における開花後日数ごとの総カプサイシノイド含有量変化を表す。

収穫したタカノツメ果実 1 本あたりの、総カプサイシノイド含有量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 3～22 回の平均と標準誤差を示す。

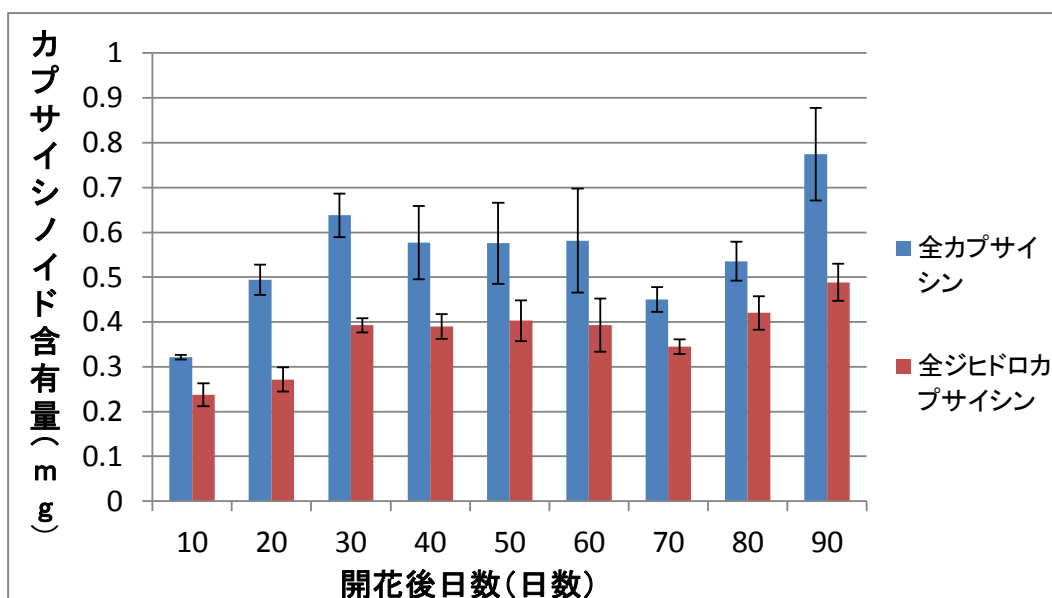


図 10. 開花後日数によるタカノツメ総カプサイシノイド含有量「2015 年」

2015 年における開花後日数ごとの総カプサイシノイド含有量変化を表す。

収穫したタカノツメ果実 1 本あたりの、総カプサイシノイド含有量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 2～17 回の平均と標準誤差を示す。

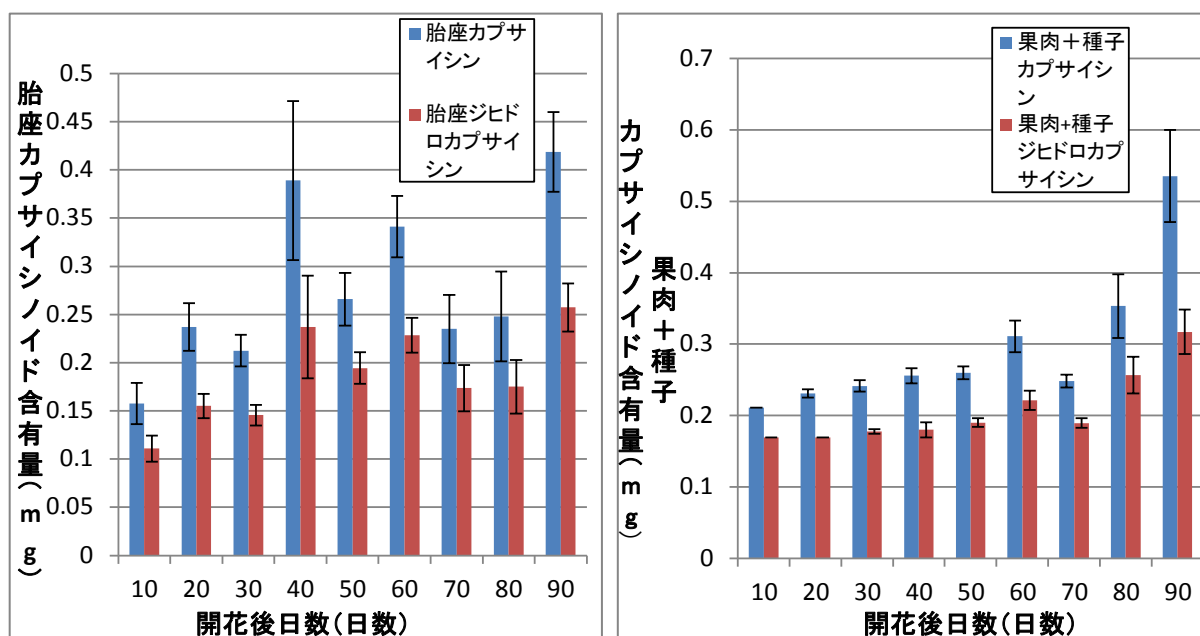


図 11. 開花後日数によるタカノツメ各組織カプサイシノイド含有量「2014 年」

2014 年における開花後日数ごとの胎座（左図）と果肉＋種子（右図）のカプサイシノイド含有量変化を表す。収穫したタカノツメ果実 1 本あたりの、胎座カプサイシノイド含有量と果肉＋種子カプサイシノイド含有量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 3～22 回の平均と標準誤差を示す。

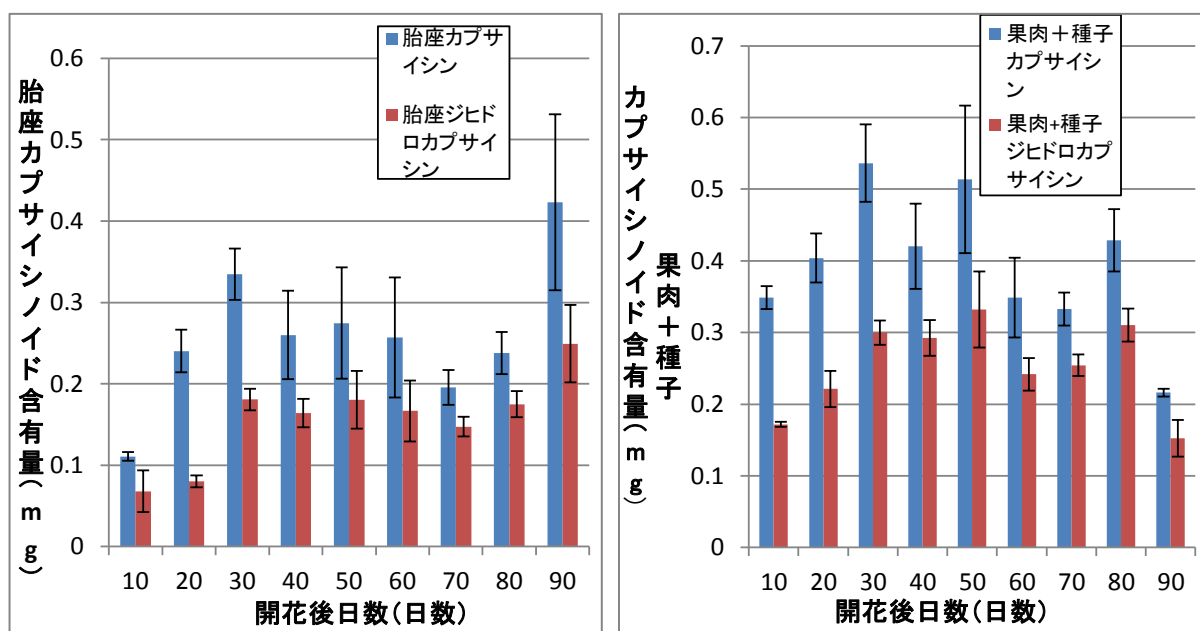


図 12. 開花後日数によるタカノツメ各組織カプサイシノイド含有量「2015 年」

2015 年における開花後日数ごとの胎座（左図）と果肉＋種子（右図）のカプサイシノイド含有量変化を表す。収穫したタカノツメ果実 1 本あたりの、胎座カプサイシノイド含有量と果肉＋種子カプサイシノイド含有量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 2～17 回の平均と標準誤差を示す。

実験 1 ④開花後日数によるハバネロ果実生重量変化

トウガラシに含まれる辛味成分含有量の開花後日数による変化を観察するにあたり、トウガラシの辛味と形態は大きくかわってくるのではないかと考えた。そこで収穫時に果実の生重量を測定し開花後日数ごとの変化を分析した。

収穫したハバネロを観察してみたところ、開花後日数増加とともに果実が大きくなり、水分量が増えていくように感じた（図 13）。ハバネロの生重量を測定してみたところ、2014 年、2015 年ともに開花後 60 日までは果実生重量が増加していくが、80 日で少し減少するという結果となった（図 14、図 15）。タカノツメと比べて大きさも大きく、水分量が多いが収穫数は少なかった。

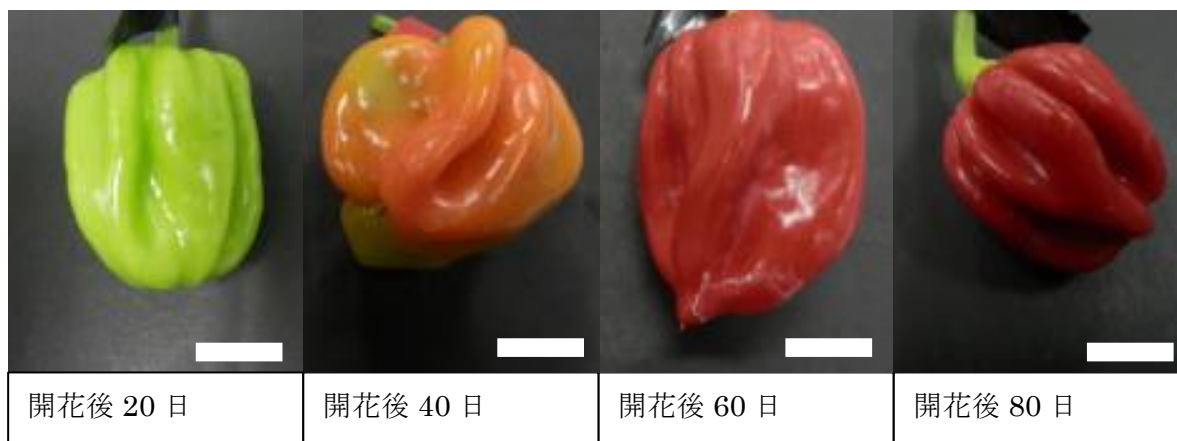


図 13. 開花後日数によるハバネロ果実写真

2015 年における開花後日数によるハバネロ果実の写真。

収穫したタカノツメの開花後 20 日、開花後 40 日、開花後 60 日、開花後 80 日の果実を収穫直後に撮影した。

スケールバーは 1cm を示す。

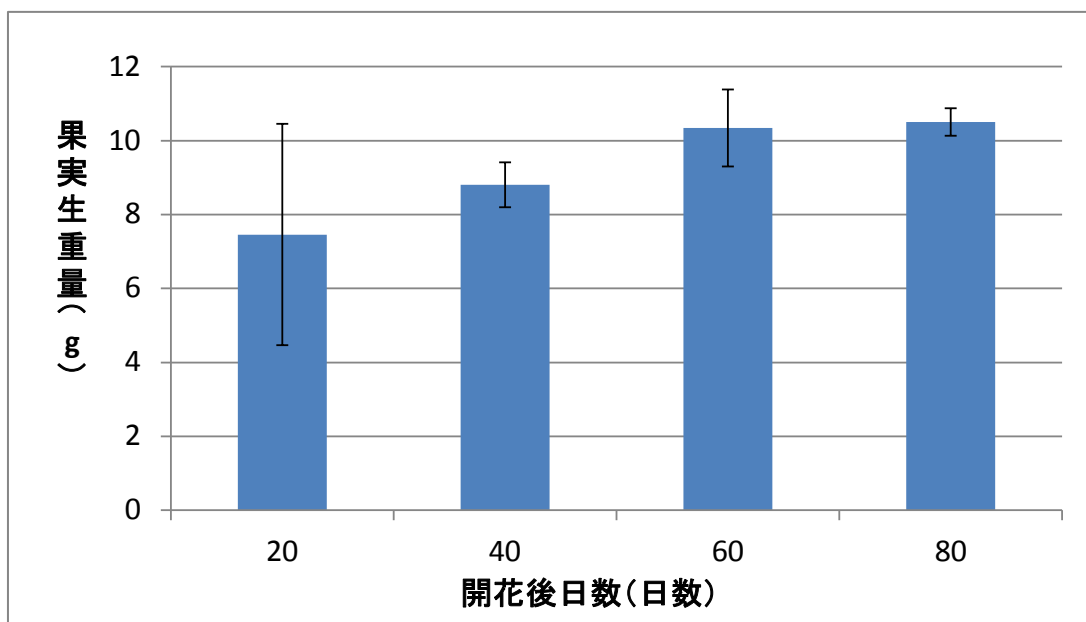


図 14. 開花後日数によるハバネロ果実生重量変化「2014 年」

2014 年における開花後日数ごとの果実生重量変化を表す。

収穫したハバネロの果実生重量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 2～9 回の平均と標準誤差を示す。

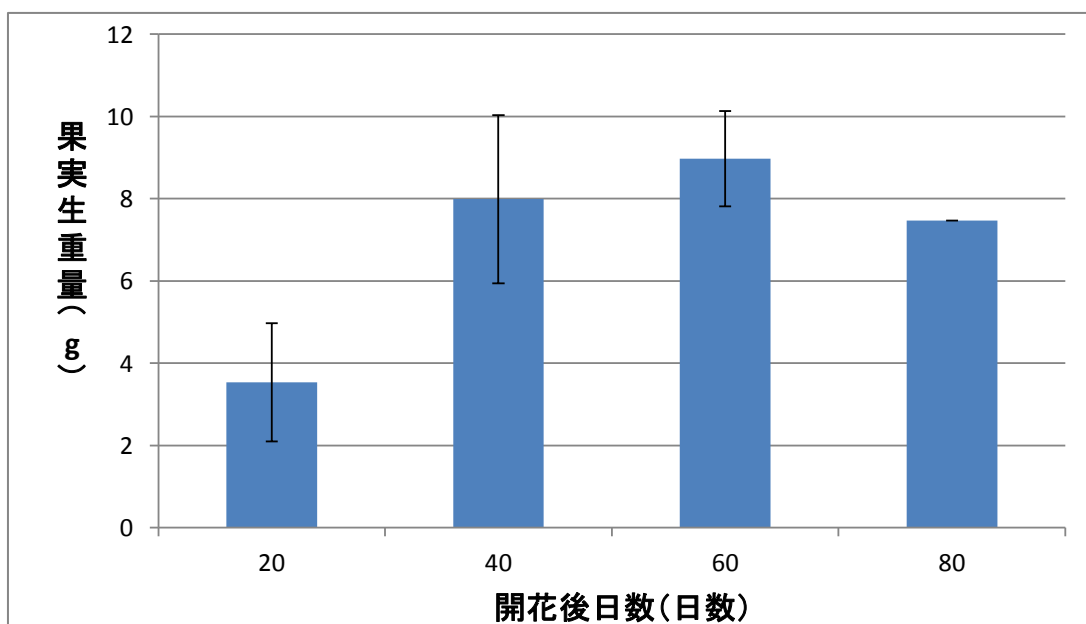


図 15. 開花後日数によるハバネロ果実生重量変化「2015 年」

2015 年における開花後日数ごとの果実生重量変化を表す。

収穫したハバネロの果実生重量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 1～4 回の平均と標準誤差を示す。

実験 1 ⑤開花後日数によるハバネロ胎座生重量変化

実験 1 ②においてタカノツメにおける胎座組織の生重量を測定し開花後日数ごとの変化を分析したが、品種の違いによる差を分析するため、世界で一番辛いとされるハバネロレッドにおいても同様に胎座組織の生重量を測定し開花後日数ごとの変化を分析した。

収穫したハバネロ果実を分解して 20 日ごとに分けて観察してみたところ、2014 年、2015 年ともに開花後 40 日まで胎座生重量が増加していきそれ以降は減少するような結果となった（図 16、図 17）。タカノツメよりももともと含まれている水分量が多いため胎座生重量が最大値になって以降、開花後日数を経つにつれ水分が抜けて縮小していくように感じた。

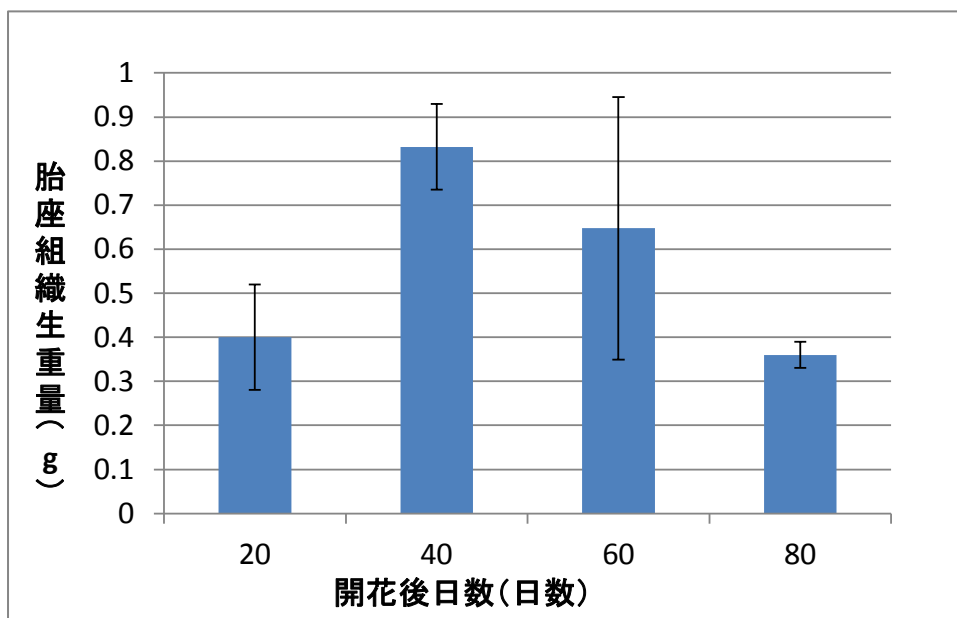


図.16 開花後日数によるハバネロ胎座生重量変化「2014 年」

2014 年における開花後日数ごとの胎座生重量変化を表す。

収穫したハバネロを胎座・果肉・種子に分解したもののうち、胎座生重量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 2 回～9 回の平均と標準誤差を示す。

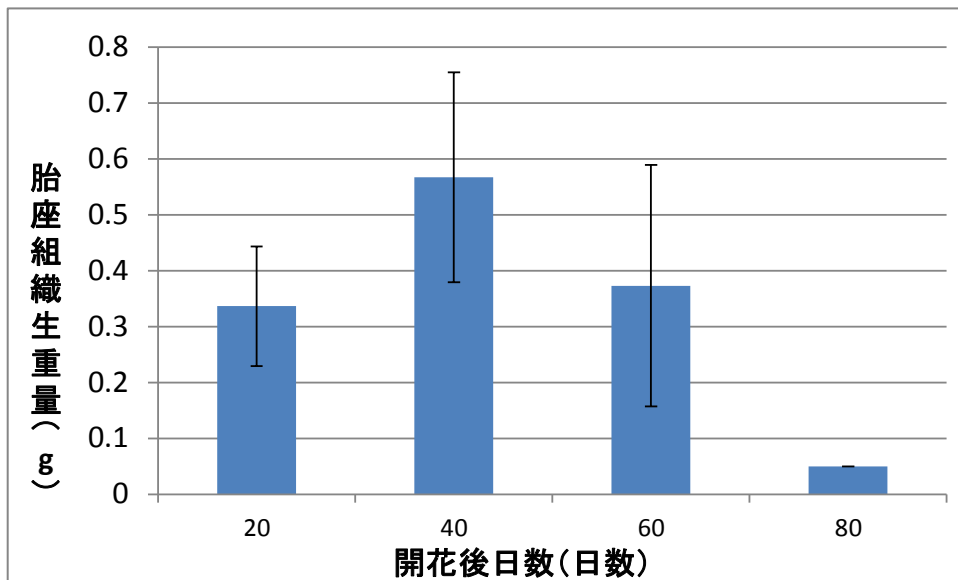


図.17 開花後日数によるハバネロ胎座生重量変化「2015 年」

2015 年における開花後日数ごとの胎座生重量変化を表す。

収穫したハバネロを胎座・果肉・種子に分解したもののうち、胎座生重量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 1 回～4 回の平均と標準誤差を示す。

実験 1 ⑥開花後日数によるハバネロ総カプサイシノイド含有量の変化

実験 1③においてタカノツメにおけるカプサイシノイド含有量を測定し開花後日数ごとの変化を分析したが、品種の違いによる差を分析するため、世界で一番辛いとされるハバネロレッドにおいても同様に各組織のカプサイシノイド含有量を測定し開花後日数ごとの変化を分析した。

2014 年と 2015 年ともにたかのつめと同傾向になり開花後日数 40 日と開花後日数後期である 80 日でカプサイシノイド含有量が高いというデータがでた（図 18、図 19）。しかし、2014 年と 2015 年ではカプサイシノイド含有量が大きく異なった（図 18、図 19）。どちらもサンプル数が少ないことから、含有量に差が出やすかった。

組織ごとにカプサイシノイド含有量を分けたところ、果肉＋種子カプサイシノイド含有量は 2014 年と 2015 年で開花後日数増加とともに増えていったが、胎座でのカプサイシノイド含有量は開花後 40 日で増加し減少後、2014 年では 80 日で再び増加し、2015 年ではそのまま減少していった（図 20、図 21）。

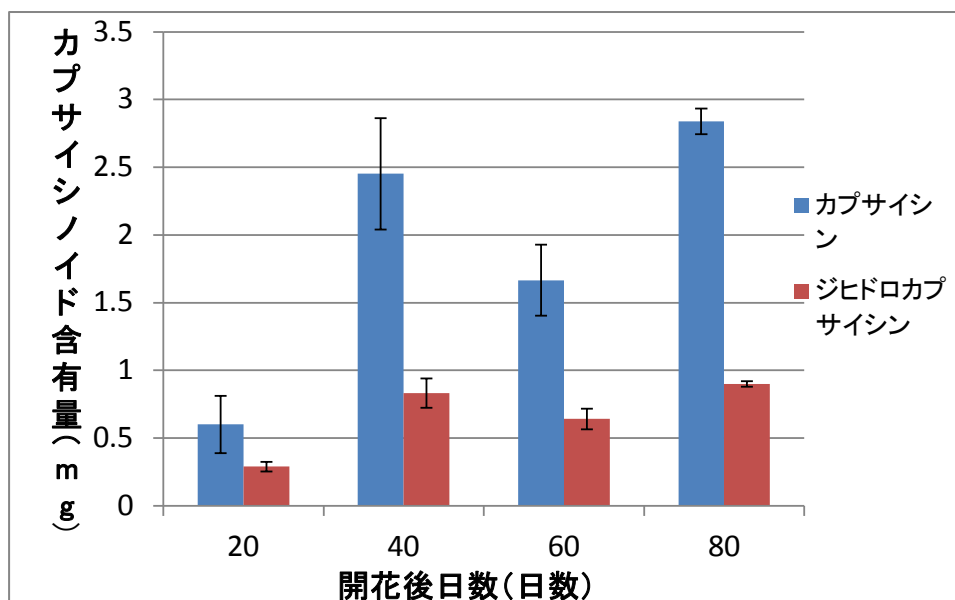


図 18. 開花後日数によるハバネロ果実総カプサイシノイド含有量「2014 年」

2014 年における開花後日数ごとの総カプサイシノイド含有量変化を表す。

収穫したハバネロ果実 1 本あたりの、総カプサイシノイド含有量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 2～9 回の平均と標準誤差を示す。

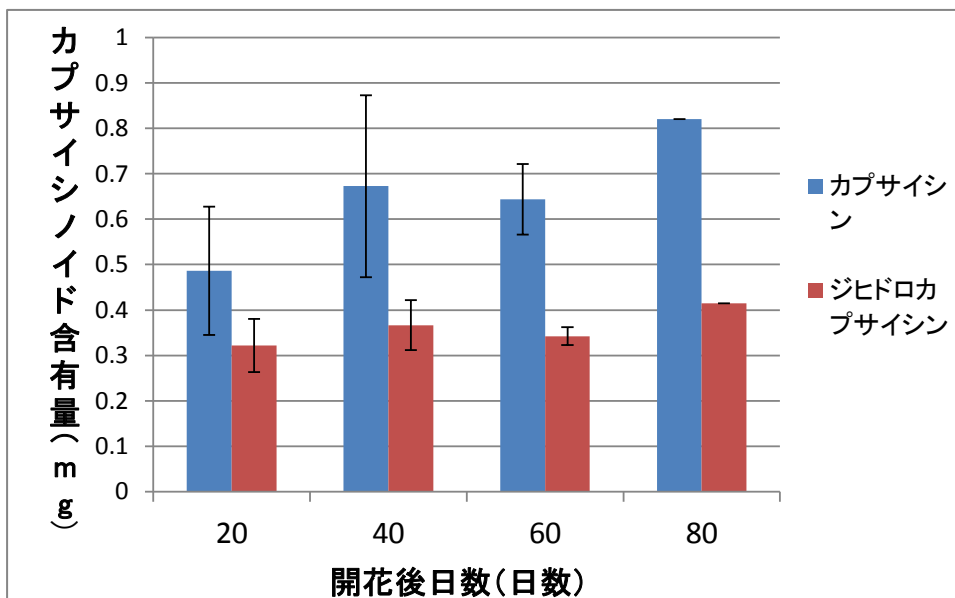


図 19. 開花後日数によるハバネロ総カプサイシノイド含有量「2015 年」

2015 年における開花後日数ごとの総カプサイシノイド含有量変化を表す。収穫したハバネロ果実 1 本あたりの、総カプサイシノイド含有量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。

実験 1～3 回の平均と標準誤差を示す。

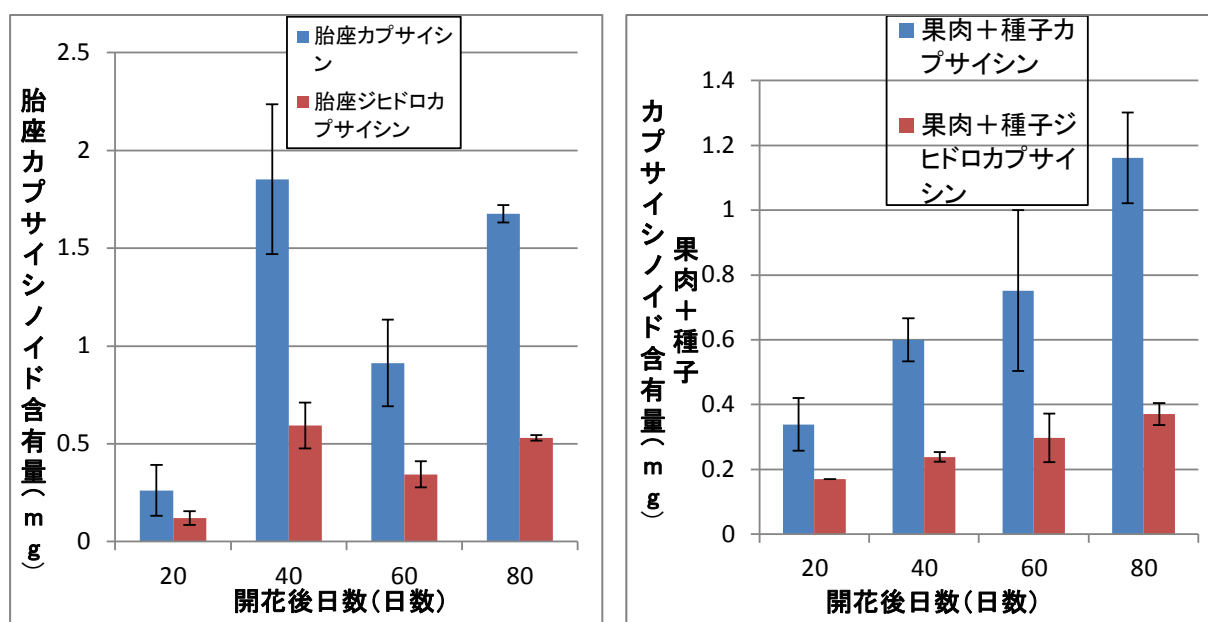


図 20. 開花後日数によるハバネロ各組織カプサイシノイド含有量「2014 年」

2014 年における開花後日数ごとの胎座（左図）と果肉＋種子（右図）のカプサイシノイド含有量変化を表す。収穫したハバネロ 1 本あたりの胎座カプサイシノイド含有量と果肉＋種子カプサイシノイド含有量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。実験 2～9 回の平均と標準誤差を示す。

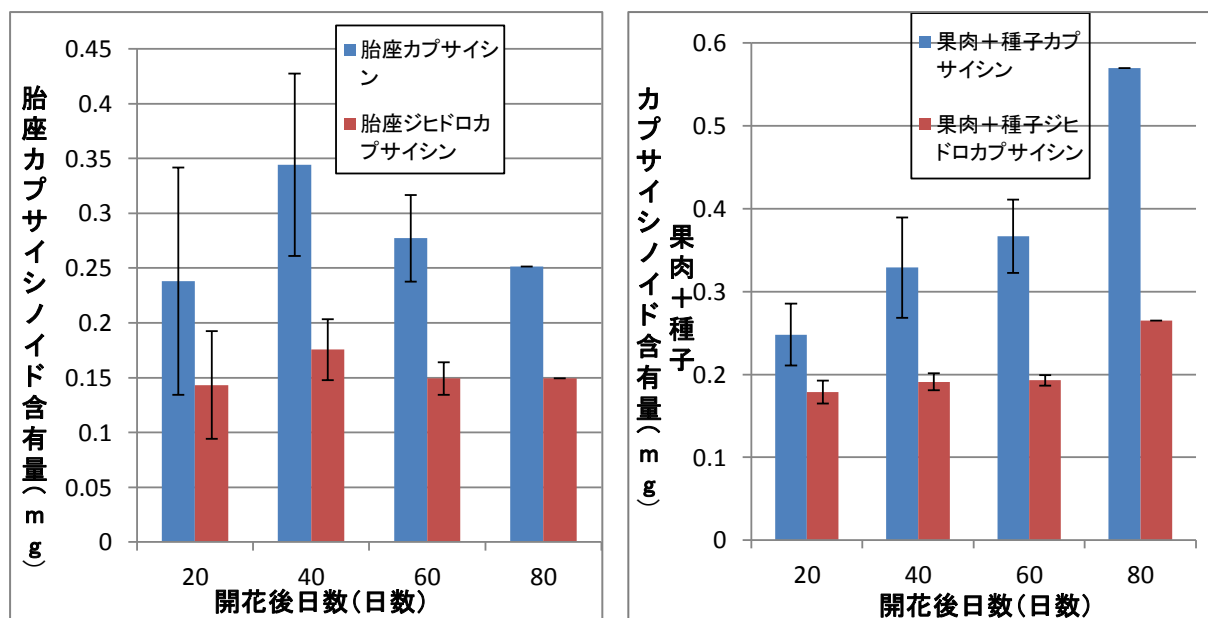


図 21. 開花後日数によるハバネロ各組織カプサイシノイド含有量「2015 年」

2015 年における開花後日数ごとの胎座（左図）と果肉＋種子（右図）のカプサイシノイド含有量変化を表す。収穫したハバネロ 1 本あたりの胎座カプサイシノイド含有量と果肉＋種子カプサイシノイド含有量を開花後日数ごとにまとめ平均値をグラフ化した。実験 1～3 回の平均と標準誤差を示す

(2) 実験2 カプサイシノイド合成系遺伝子の開花後日数による発現量比較

目的

トウガラシにおけるカプサイシノイド生合成関連遺伝子の週齢による発現量解析を行うことでトウガラシ果実の成長とカプサイシノイド合成との関係を明確化する。

材料

- ・タカノツメ (*Capsicum annuum*)
- ・ハバネロレッド (*Capsicum chinense*)

手法

実験1と同様の方法で栽培し、収穫したトウガラシを組織ごとに分け液体窒素で凍結し-80℃で冷凍保存した。

乳鉢内で冷凍保存した各組織と液体窒素を入れ組織を摩砕し、RNAiso plus (タカラ) を 500 µL 入れ細胞を破碎した後、破碎液にクロロホルムを 100 µL 加え添加してよく混和し、12,000rpm で 10 分間遠心機にかけ 3 層に分離した。

RNA が含まれている上部の透明な水層を取り出し、同量のイソプロパノールを加え、12,000 rpm で 10 分間遠心機にかけた。上清を捨て、75 %エタノールを 500 µL 加え、12,000 rpm で 3 分間遠心機にかけることで RNA を抽出した。

リアルタイム PCR に掛けるため、cDNA は ReverTra Ace® (TOYOBO) を用いて合成し、リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現量解析は 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems USA) で試薬として THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を使った。使用したプライマーは表 4 に示した。

※内在性コントロールとしてユビキチン (ubiquitin) 遺伝子を用いた (表 5)。

これらを用い、カプサイシノイド合成段階の中で脂肪酸合成に関わるケトアシル合成酵素 (Ketoacyl synthase : *Kas*) (図 22) に対してリアルタイム PCR 法による遺伝子発現量の解析を行った。

表 4. 使用プライマー配列

No.	Name	Sequence (5` to 3`)
①	CaKasSCf3	CAT TAG AAG AGG CGAAGC TGA T
②	CaKasSCr3	GAG ACA AGG CTC GAC AAG CTA T

表 5. 内在性コントロールプライマー配列

	Name	Sequence(5` to 3`)
①	CaUBI3SCf1	AAT TCA TTT CCC TCC GGA TTA T
②	CaUBI3SCr1	AGC AGG ACC TTC GAT ATG GTT A

カプサイシノイドはバニルルアミンと分岐鎖脂肪酸がアミド結合することで合成され、と考えられているが、これらの反応を触媒するカプサイシン合成酵素 (Capsaicin synthase ; CS) は特定されていない。いっぽう、バニルルアミンを合成するフェノルプロパノイド系の生合成酵素の一つ、Phenylalanine ammonia lyase (*Pal*) や、脂肪酸合成に関わる生合成酵素、Acyl carrier protein (*Acl*)、ケトアシル合成酵素 (Ketoacyl synthase : *Kas*) などがあり、遺伝子発現量は辛味のレベルと相関関係にある【17】。これらのうち、本研究では、カプサイシノイド合成経路の中のバニリンからバニルルアミンを合成し、胎座に関連する組織において最も多く発現が確認されている *Kas*【18】に対してリアルタイム PCR 法による遺伝子発現量の解析を行った。

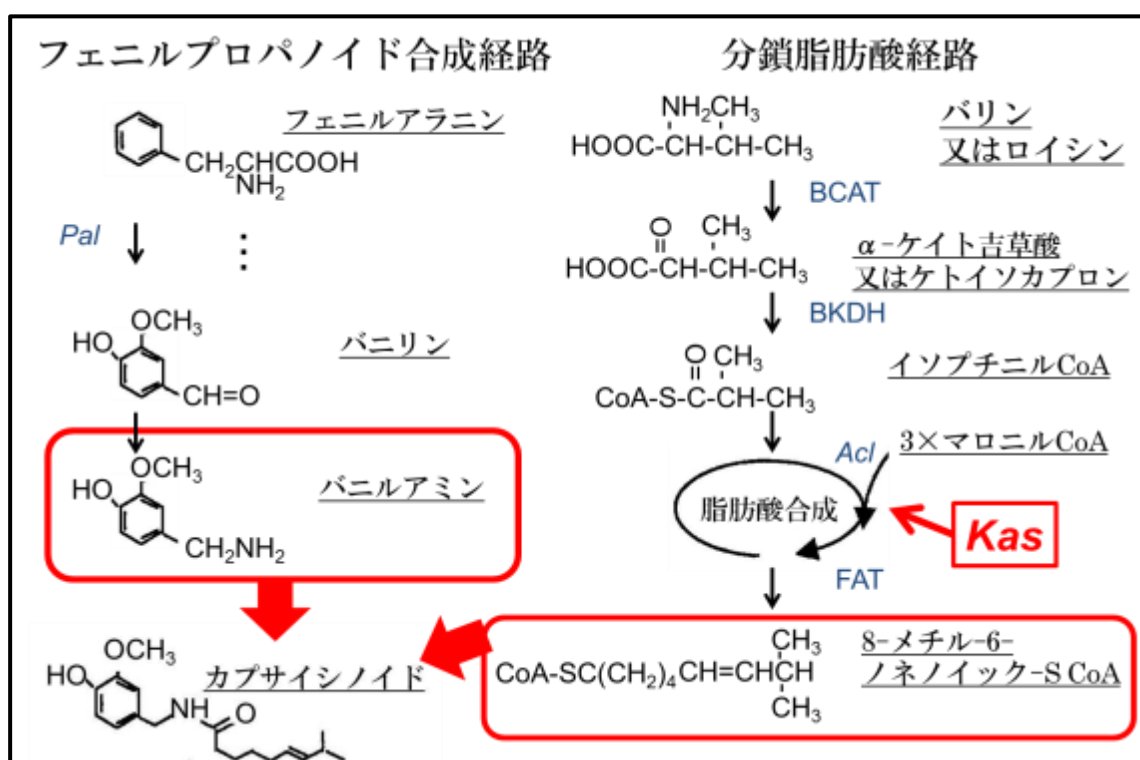


図 22 : カプサイシノイド合成経路

(田中 義行 トウガラシの辛味成分に関する遺伝育種) より引用・改変【16】

結果

実験 2 ① *Kas* 遺伝子の胎座における果肉に対する発現量比の開花後日数による変化

実験 1 において、トウガラシ果実のカプサイシノイド含有量を測定したところ、開花後 40 日ごろと開花後 90 日の果実で増加することが分かった。そこでカプサイシノイド合成に関わるケトアシル合成酵素 (Ketoacyl synthase, *Kas*) 遺伝子の週齢による発現量解析を行うことでトウガラシがどの時期にカプサイシノイドを合成しているのか遺伝的な側面から分析した。

リアルタイム PCR 法にて、果肉と胎座組織との *Kas* 遺伝子発現量比を求めた。

2014 年には胎座における *Kas* 遺伝子発現量を果肉での *Kas* 遺伝子発現量で割ったものを開花後日数ごとに分けグラフ化した。すると *Kas* 遺伝子の発現量は開花後 30 日での発現量比がもっとも高く、その後低下した (図 23)。しかし実験 1 においてカプサイシノイド含有量の値が高くでた開花後 90 日の果実では収穫数が少なくなってしまった点と RNA 抽出の作業を安定して行うことができなかったため、実際に解析を行うことができなかった。

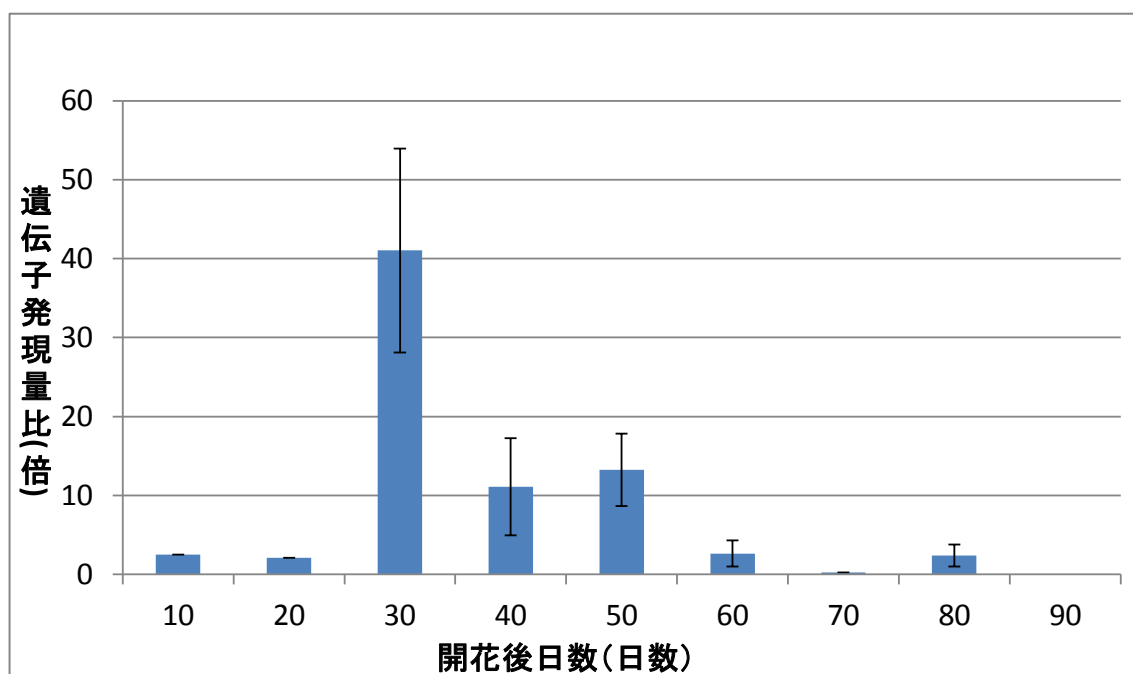


図 23. *Kas* 遺伝子の胎座における果肉に対する発現量比の開花後日数による変化。

トウガラシのカプサイシノイド合成に関わる遺伝子のうちケトアシル合成酵素 (Ketoacyl synthase : *Kas*) の遺伝子発現量の解析をリアルタイム PCR 法によって行った。カプサイシノイドを合成する胎座における *Kas* 遺伝子発現量を果肉での *Kas* 遺伝子発現量で割ったものを開花後日数ごとに分けグラフ化した。値は各開花後日数で回収した胎座 (1~13 個) から得られた平均値と標準誤差を表す。

実験 2 ②タカノツメ果肉と胎座における *Kas* 遺伝子発現量の開花後日数による変化の葉に対する比較

実験 2①においてリアルタイム PCR 法にて、果肉と胎座組織との *Kas* 遺伝子発現量比を求め、胎座における *Kas* 遺伝子発現量を果肉での *Kas* 遺伝子発現量で割ったものを開花後日数ごとにグラフ化した。しかしカプサイシノイドが胎座から果肉に移行するため、果肉における *Kas* 遺伝子発現量自体が一定ではない可能性が示唆できる。そこで 2015 年には果肉や胎座での *Kas* 遺伝子発現量をカプサイシノイドが一切含まれない葉における *Kas* 遺伝子発現量で割ったものを開花後日数ごとにグラフ化した。

全体的に果肉よりも胎座での発現量比が数倍高く出る傾向にあった (図 24)。胎座における発現量比は開花後日数増加とともに増加していき 60 日で最も高い値がでたが、それ以降は減少傾向にあった (図 24)。一方果肉では大幅な変化はなかったものの、開花後 70 日で最も高くなるという結果になった (図 24)。また実験 2①と同様にカプサイシノイド含有量が高くでた開花後 10 日 90 日の果実では収穫数が少なくなってしまった点と RNA 抽出の作業を安定して行うことができなかったため、胎座では開花後 10 日、果肉では 10 日と 90 日で解析を行うことができなかった。

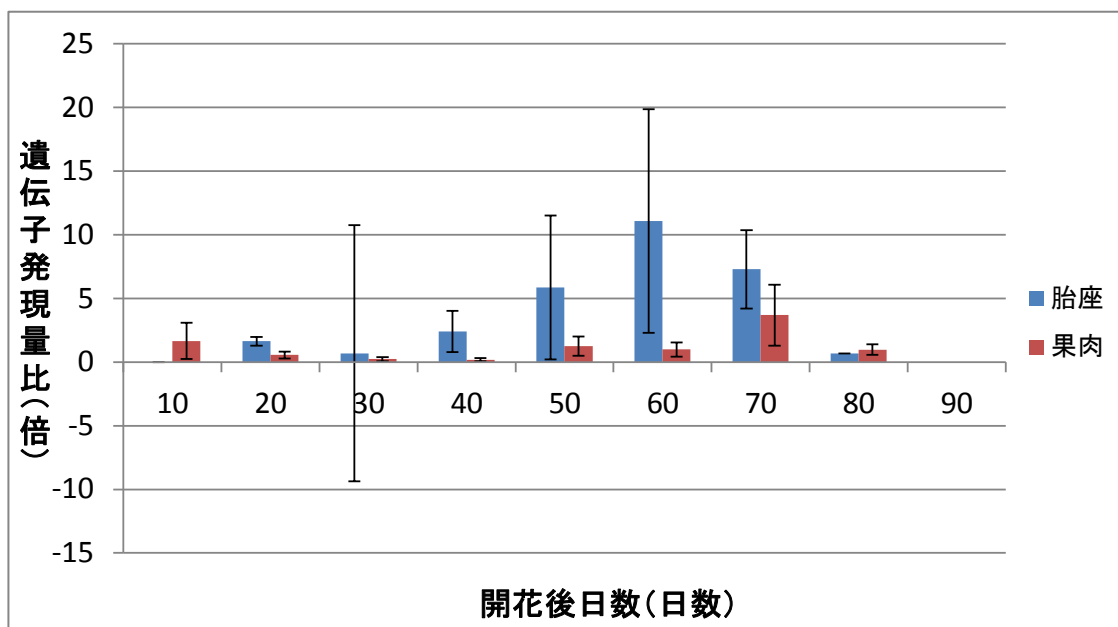


図 24. タカノツメ果肉と胎座における *Kas* 遺伝子発現量の開花後日数による変化の葉に対する比較

タカノツメのカプサイシノイド合成に関わる遺伝子のうちケトアシル合成酵素

(Ketoacyl synthase : *Kas*) の遺伝子発現量の解析をリアルタイム PCR 法によって行った。カプサイシノイドを合成する胎座と果肉における *Kas* 遺伝子発現量を葉での *Kas* 遺伝子発現量で割ったものを開花後日数ごとに分けグラフ化した。

値は各開花後日数で回収した胎座 (1~11 個) から得られた平均値と標準誤差を表す。

実験 2 ③ハバネロ果肉と胎座における *Kas* 遺伝子発現量の開花後日数による変化の葉に対する比較

実験 2②での実験と同様にハバネロにおいても果肉や胎座での *Kas* 遺伝子発現量をカプサイシノイドが一切含まれない葉っぱにおける *Kas* 遺伝子発現量で割ったものを開花後日数ごとにグラフ化した。

全体的に果肉よりも胎座での発現量比が数倍高く出る傾向にあった(図 25)。胎座における発現量比は開花後 40 日で最も高い値がでたが、それ以降は減少傾向にあった(図 26)。一方果肉では大幅な変化はなかったものの、開花後 80 日において他の開花後日数よりも 2 倍程度高い値が出た(図 25)。

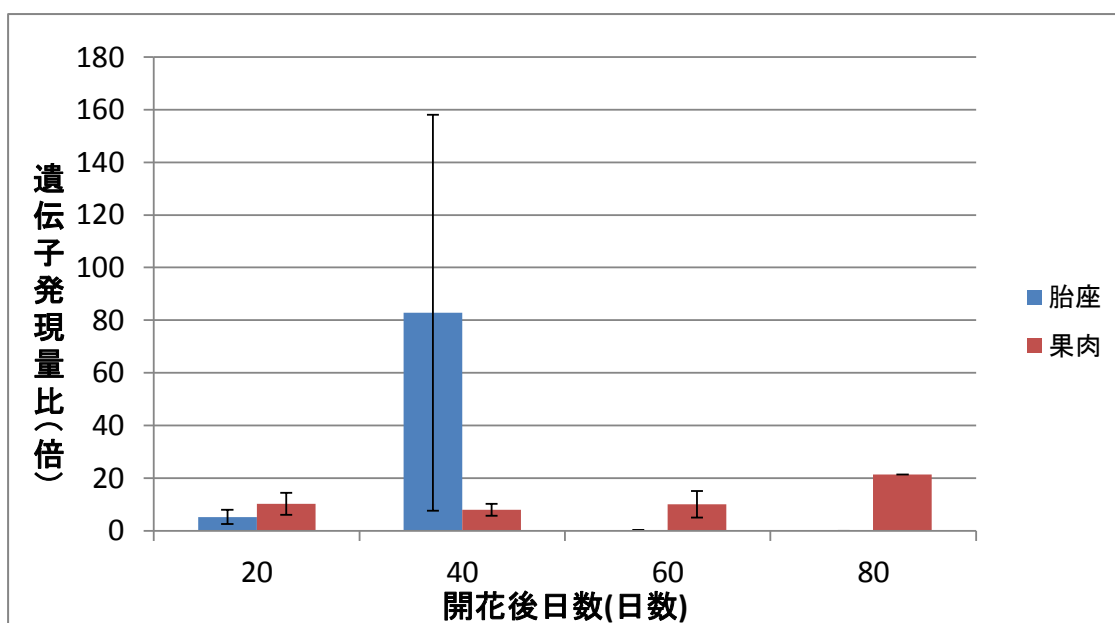


図 25. ハバネロ果肉と胎座における *Kas* 遺伝子発現量の開花後日数による変化の葉に対する比較

ハバネロのカプサイシノイド合成に関わる遺伝子のうちケトアシル合成酵素 (Ketoacyl synthase : *Kas*) の遺伝子発現量の解析をリアルタイム PCR 法によって行った。カプサイシノイドを合成する胎座と果肉における *Kas* 遺伝子発現量を葉での *Kas* 遺伝子発現量で割ったものを開花後日数ごとに分けグラフ化した。

値は各開花後日数で回収した胎座 (1~5 個) から得られた平均値と標準誤差を表す。

(3) 実験3 培地上でのカプサイシノイドが示す植物病原菌抑制効果の検証

目的

トウガラシ果実に含まれるカプサイシノイドには強い抗菌効果があると言われているため、食品保存や園芸分野で利用されることも多い。

植物病原菌を培養しやすく、カプサイシノイド濃度を調節しやすい培地上で実験をすることで、カプサイシノイドが植物病原菌にどのような効果を示すのかを検証し、トウガラシを使った生物農薬などの植物防除に応用する可能性を探った。

材料

- ・カプサイシノイド

植物病原菌は3.材料に記載した菌類を使用した。

- ・細菌類 (4 種類)
- ・真菌類 (5 種類)

使用培地の組成

- ・PDA 培地

Difco Potato Dextrose Agar 39 g/L

粉末寒天 3 g/L

- ・NA 培地

Difco Nutrient Agar 21 g/L

粉末寒天 3 g/L

- ・N 培地 (液体培地)

Beef Extract 3 g/L

Peptone 5 g/L

最終 PH 5.8

手法

・細菌類

スキムミルク内で $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷凍保存されていた細菌を NA 斜面培地で 2 日培養した後、液体培地に移植し 2 日間振盪培養した。2 日間培養した細菌懸濁液を NA 平板培地に塗布しコンラージ棒で全体に広げた後、NA 培地の中央にろ紙を置き 1 mM のカプサイシン溶液を $10\text{ }\mu\text{L}$ 添加する。 $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターで 1 週間培養後、細菌が増えず阻止円を形成した部分の直径を計測した。

ネガティブコントロールとしてろ紙にエタノールを $10\text{ }\mu\text{L}$ 添加した区と、ポジティブコントロールとしてろ紙にハイグロマイシン (50 mg/mL) を $10\text{ }\mu\text{L}$ 添加した区を同時に作成した。

・真菌類

真菌を PDA 平板培地に移植後、2 日～1 週間培養する。培養した真菌が生育している培地をコルクボーラーで打ち抜き、カプサイシノイド濃度が 1 mM に調整してある PDA 平板培地の中央に乗せ $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターで 1 週間培養後、菌叢の直径を計測した。

ネガティブコントロールとしてエタノールを 1.5 mL/L に調整している培地と、ポジティブコントロールとしてろ紙にハイグロマイシン 50 mg/L に調整している培地を同時に作成した。

培地のカプサイシノイド濃度の設定するにあたり、タカノツメ・ハバネロのカプサイシノイド濃度を参考にした。

結果

実験 3① カプサイシノイド 1 mM が示す植物病原菌抑制効果の検証

実験 1、2 において、開花後日数 30～40 日程度のトウガラシ果実が平均的に辛くカプサイシノイド含有量が多いということが判明した。そこでこれらのトウガラシ果実を使い、カプサイシノイドが示す物病原菌抑制効果を検証した。まずは、培地上でカプサイシノイドと物病原菌を利用し、カプサイシノイドが物病原菌をどの程度抑制するのか分析した。

細菌を塗布した培地では、1 週間程度するとコロニーを形成するが、ろ紙の周りに阻止円を形成した（図 26）。

一方真菌類では菌を置床し 1 週間した後に菌糸の長さを計測した（図 27）。1 週間以内にネガティブコントロールの菌糸が培地いっぱいまで広がったものは、その日に菌糸の長さを計測した（図 28）。

細菌類ではハイグロマイシン添加培地ほどではないが、カプサイシンを添加した培地の方が滅菌水を添加した培地よりも阻止円の直径が大きくなったが、直径自体の大きさが小さく差はあまり出なかった。また細菌の種類による違いはほとんど見られなかった（図 29）。

一方真菌類ではハイグロマイシン添加培地以下であるが、ほとんどの真菌でエタノール添加培地よりもカプサイシン添加培地で菌糸の伸長が抑制された。特に *Phytophthora capsici* と *Pythium splendens* でカプサイシン添加培地の菌糸直径がエタノール添加培地の菌糸直径の半分程度に抑制されていた（図 30）。しかし、*Verticillium dahliae* ではエタノール添加培地とカプサイシン添加培地による菌糸直径の違いは見られなかった（図 30）。

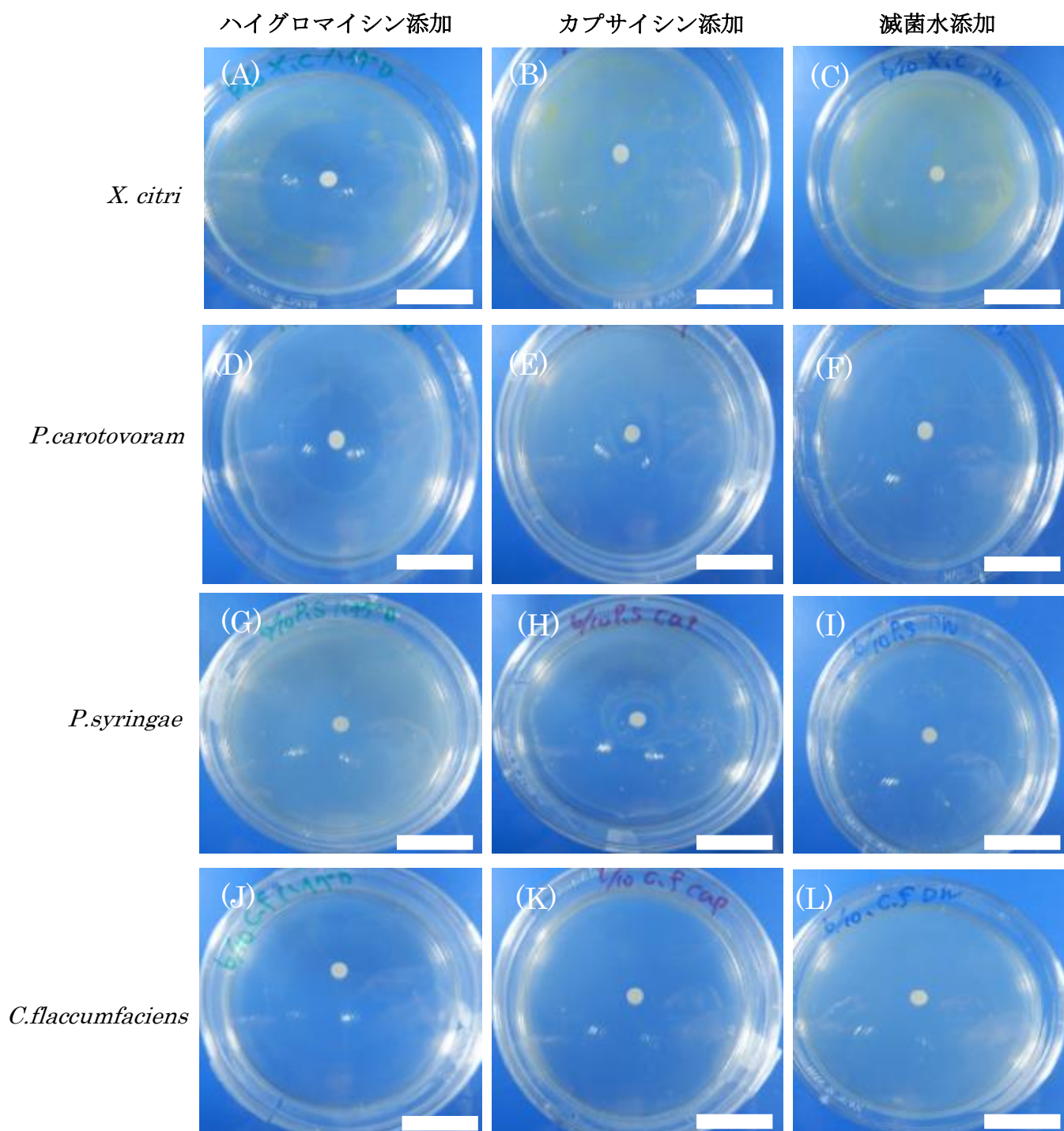


図 26. 細菌類を塗布しカプサイシン添加した培地 (1 週間後)

(A) ~ (C) *Xanthomonas citri* (D) ~ (F) *Pectobacterium carotovorum*

(G) ~ (I) *Pseudomonas syringae* (J) ~ (L) *Curtobacterium flaccumfaciens*

それぞれ左からハイグロマイシン、カプサイシン、滅菌水 添加培地

スケールバーは 3 cm を示す。

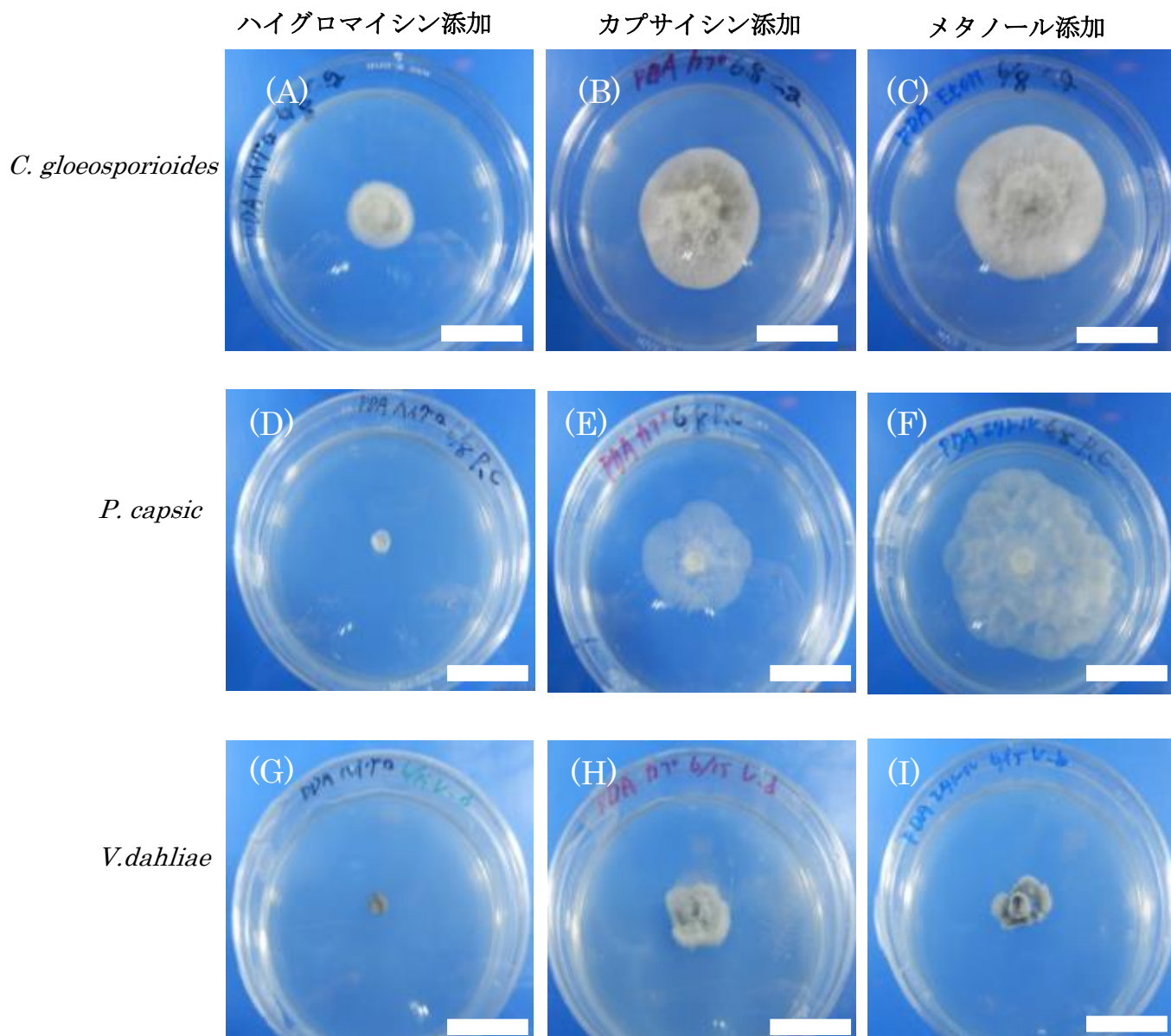


図 27. 真菌類を置床し 1 週間後に観察した培地

(A) ~ (C) *Colletotrichum gloeosporioides* (D) ~ (F) *Phytophthora capsic*

(G) ~ (I) *Verticillium dahliae*

真菌類を置床し一週間しても培地全体に菌糸が広がらなかった真菌類。

それぞれ左からハイグロマイシン、カプサイシン エタノール 添加培地

スケールバーは 3 cm を示す。

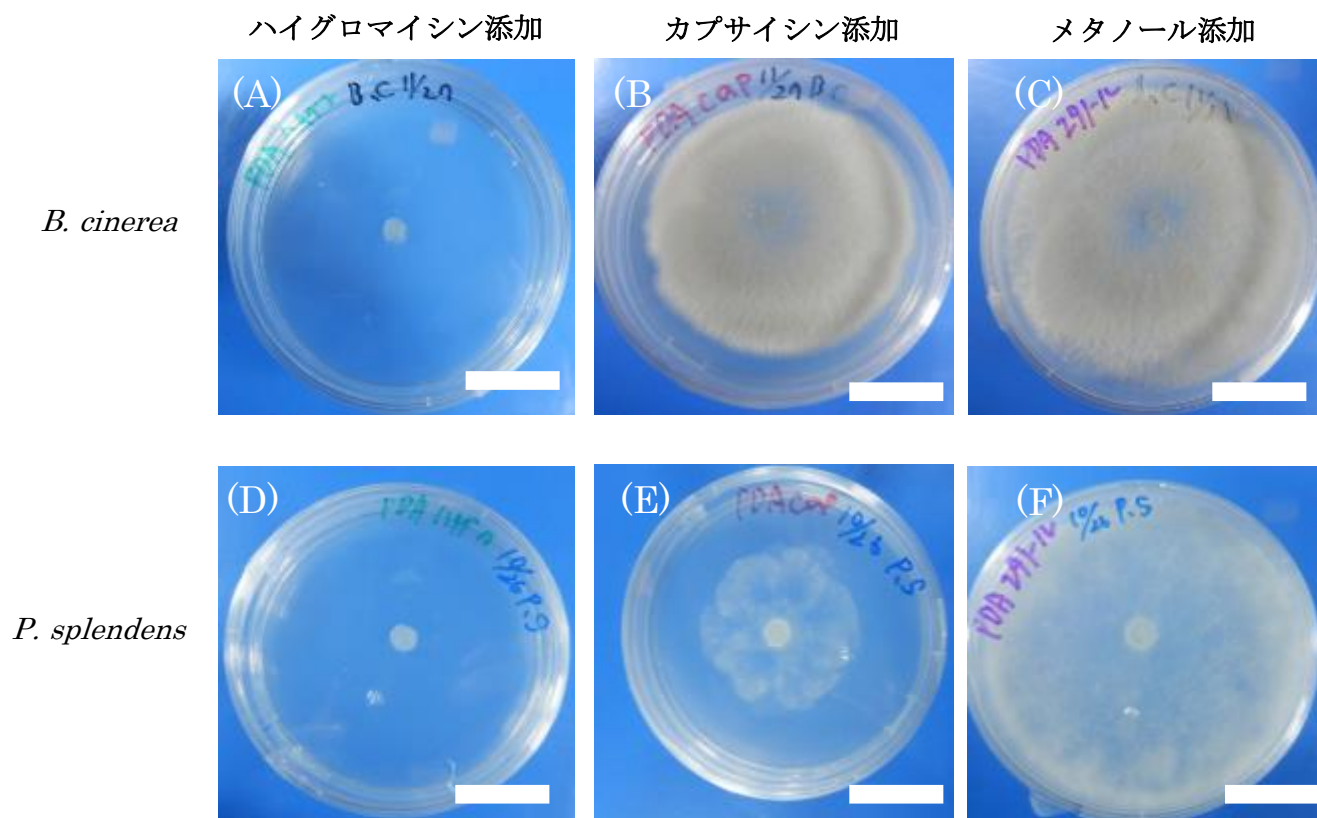


図 28. 真菌類を置床し 2 日～4 日後に観察した培地

(A) ～ (C) *Botrytis cinerea* (D) ～ (F) *Pythium splendens*

真菌類を置床し一週間以内に培地全体に菌糸が広がった真菌類。

それぞれ左からハイグロマイシン、カプサイシン エタノール 添加培地

スケールバーは 3 cm を示す。

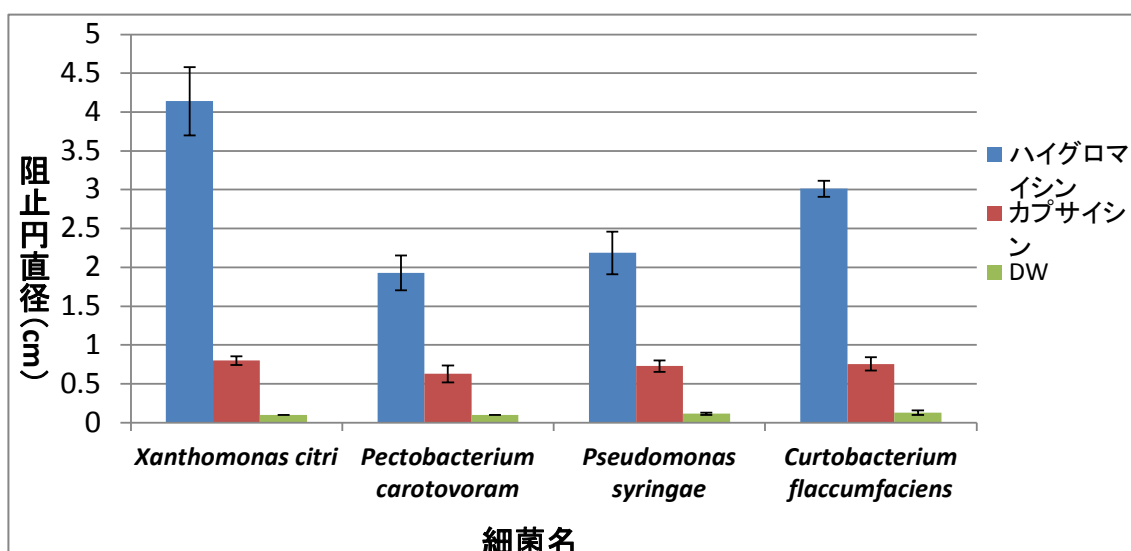


図 29. 細菌類に対するカプサイシノイドが示す増殖抑制効果

NA 平板培地に細菌液を塗布し、中央にろ紙を置いた上からカプサイシノイド 1 mM を 10 μ L 添加したものを 1 週間後に観察し、ろ紙の周りの阻止円の直径を計測したグラフ。ネガティブコントロールとして滅菌水を使用し、ポジティブコントロールとしてハイグロマイシン 50 mg/mL を 10 μ L 添加したものをを用いた。

値は実験 4～6 回の平均と標準誤差を示す。

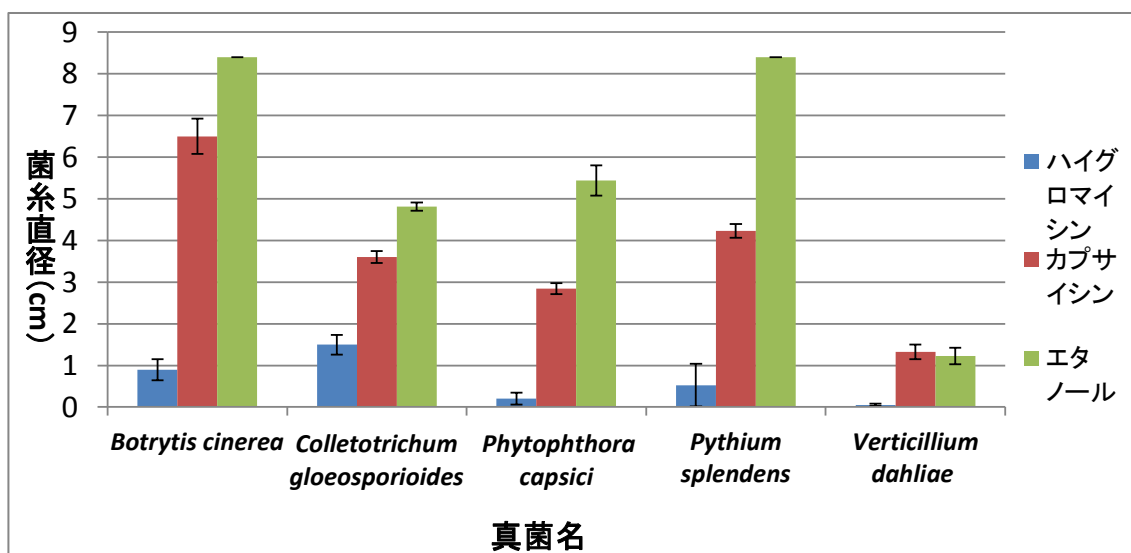


図 30. 真菌類に対するカプサイシノイドが示す菌糸伸長抑制効果

カプサイシノイドが 1 mM に調整済みの PDA 平板培地の中央にコルクボーラーで打ち抜いた真菌を置き、1 週間後に観察し菌糸の直径を計測したグラフ。一週間以前にネガティブコントロールの菌糸が全体に広がったものはその時点の菌糸の直径を計測した。ネガティブコントロールとしてエタノール調整培地を使用し、ポジティブコントロールとしてハイグロマイシン 50 mg/L 調整培地を使用した。

値は実験 8 回の平均と標準誤差を示す。

実験 3② カプサイシノイド 10 mM が示す植物病原菌抑制効果の検証（細菌）

実験 3①において、細菌では真菌ほどの植物病原菌抑制効果は見られなかった。しかし、この結果に対してカプサイシノイド濃度という視点で注目してみた際、真菌に対するカプサイシノイドの抗菌効果を検証する実験ではカプサイシノイドを培地に入れ 1 mM に調整済みの培地を使用したのに対して、細菌に対するカプサイシノイドの抗菌効果を検証する実験ではろ紙の上から 1 mM のカプサイシノイド溶液を添加したため、全体のカプサイシノイド濃度が薄まり抗菌効果が真菌ほどでなかったのではないかという疑問が生じた。この疑問を解消するため、カプサイシノイドを実験 3①の 10 倍濃い 10 mM にしたカプサイシノイドをろ紙に添加することで阻止円の直径にどのような違いが出るか検証した。

細菌を塗布し、10 mM のカプサイシノイドをろ紙に添加した培地を 1 週間インキュベーターで保管し、ろ紙の周りにできた阻止円の直径を計測してみたが、1 mM のカプサイシノイドを添加した培地と比較しても阻止円の大きさはほとんど変わらない結果になった。このことから実験 3①においてカプサイシノイドの濃度に関する疑問は解消されたと考えた。

(4) 実験4 トウガラシ果実が示す植物病原菌抑制効果の検証

目的

実験3において培地上でのカプサイシノイドが示す植物病原菌抑制効果の検証したが、実際にカプサイシノイドが含まれているトウガラシ果実を使用し実験をすることで、カプサイシノイドが植物病原菌にどのような影響を与えるかを探った。

材料

- ・ハバネロレッド (*Capsicum chinense*)
- ・タカノツメ (*Capsicum annuum*)
- ・ピーマン (*Capsicum annuum*) *

* カプサイシノイドが含まれていないネガティブコントロールとして、市販されているピーマン (*Capsicum annuum*) を使用した。

植物病原菌は3.材料に記載した菌類を使用した。

- ・細菌類 (4種類)
- ・真菌類 (5種類)

手法

・細菌類

スキムミルク内で -80°C 冷凍保存されていた細菌を NA 斜面培地で 2 日培養した後、再び NA 斜面培地に移植し 2 日間培養した。培養した斜面培地の細菌を白金耳で掻き出し、10 mL の滅菌水に入れたものを原液とした。原液の菌濃度は 10^8 cfu/ml とした。超純水をかけたペーパータオルが敷かれたタッパー内に縦に切ったトウガラシ果実とピーマン果実を並べ、針束によって傷をつけた。菌液を 10 倍 (10^7 cfu/ml) 希釈、100 倍 (10^6 cfu/ml) 希釈、1000 倍 (10^5 cfu/ml) 希釈したものを接種区とし、噴霧器を使ってタッパー内のピーマンとトウガラシに 20 mL 噴霧接種した後 23°C のインキュベーターに保管した。

接種後 4 日目に観察し、トウガラシ果実とピーマン果実の病徴程度を 0（発病なし）～4（重度）とした。そして発病度＝「 $\{\sum (\text{程度別発病果実数} \times \text{発病指数}) / \text{調査果実数} \times 4\} \times 100$ 」とすることでトウガラシ果実とピーマン果実の発病度を比較した。

・真菌類

真菌を PDA 平板培地に移植後、2 日～1 週間培養したものを接種菌として使用した。超純水をかけたペーパータオルが敷かれたタッパー内に縦に切ったトウガラシとピーマンを並べた。針束によって傷をつけたもの（有傷区）と傷をつけないもの（無傷区）を作製した。培養した培地をコルクボーラーでくり抜きトウガラシとピーマンに接種した後 23°C のインキュベーターに保管した。

接種後 4 日目に観察し、トウガラシ果実とピーマン果実の病徴程度を 0（発病なし）～4（重度）とした。そして発病度＝「 $\{\sum (\text{程度別発病果実数} \times \text{発病指数}) / \text{調査果実数} \times 4\} \times 100$ 」とすることでトウガラシ果実とピーマン果実の発病度を比較した。

結果

実験 4 ①ハバネロが示す植物病原菌抑制効果の検証

実験 3 で細菌・真菌に対するカプサイシノイドの抗菌効果を検証し、菌類によって差はあるものの細菌・真菌ともに抗菌効果を確認できた。しかし実験 3 では培地上での検証のみであった。そこで実際に辛みのあるトウガラシ果実と市販で販売されている辛みのないピーマン果実に植物病原菌を接種し病徴程度を比較することで、植物上でのカプサイシノイドが示す抗菌効果を検証した。

まず実験 4 では、ハバネロ果実にカプサイシノイドが含まれていることと、市販のピーマン果実にカプサイシノイドが含まれていないことを確認するため HPLC を使用し、カプサイシノイドの含有量を測定し、これらのサンプルを使用し接種試験を試みた（図 31）。

細菌類を接種したところ *Pectobacterium carotovorum* のみ感染が確認され、これらの発病程度を 0（病徴なし）～4（重度）と評価することにした（図 32、表 6）。発病程度をもとに発病度をグラフにしたが、 10^7 cfu/mL のみピーマン果実とハバネロ果実で発病度の違いは少し見られたが他の濃度では大きな違いは見られなかった（図 33、34）。

一方真菌類ではどの菌でも無傷区では病徴が確認できず、*Botrytis cinerea*、*Phytophthora capsici*、*Pythium splendens* の有傷区で感染が確認された。細菌と同様に発病程度を 0（病徴なし）～4（重度）とし（図 32、表 7）発病度をグラフ化したところ、*Phytophthora capsici* でハバネロの病徴がピーマンの病徴の半分程度に抑えられた（図 33、図 35）。

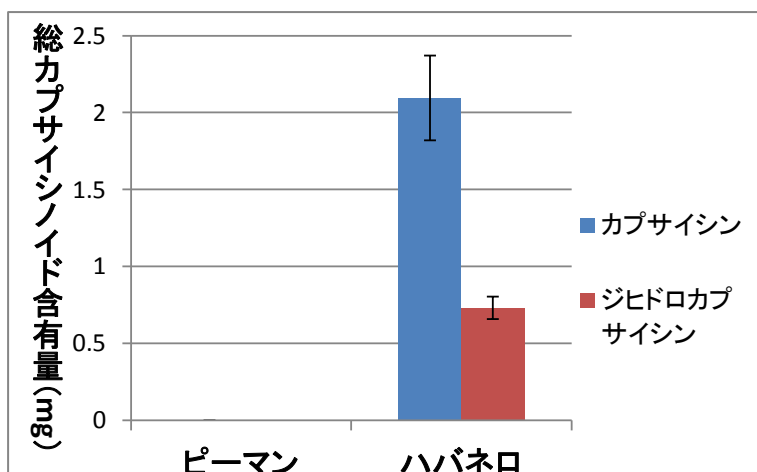


図 31. ピーマンとハバネロに含まれる総カプサイシノイド含有量の比較。

収穫したハバネロ果実と市販のピーマン果実のカプサイシノイドを HPLC により測定し、含有量を計算したグラフ

値は回収したハバネロ（17 個）と市販のピーマン（2 個）から得られた平均値と標準誤差を表す。

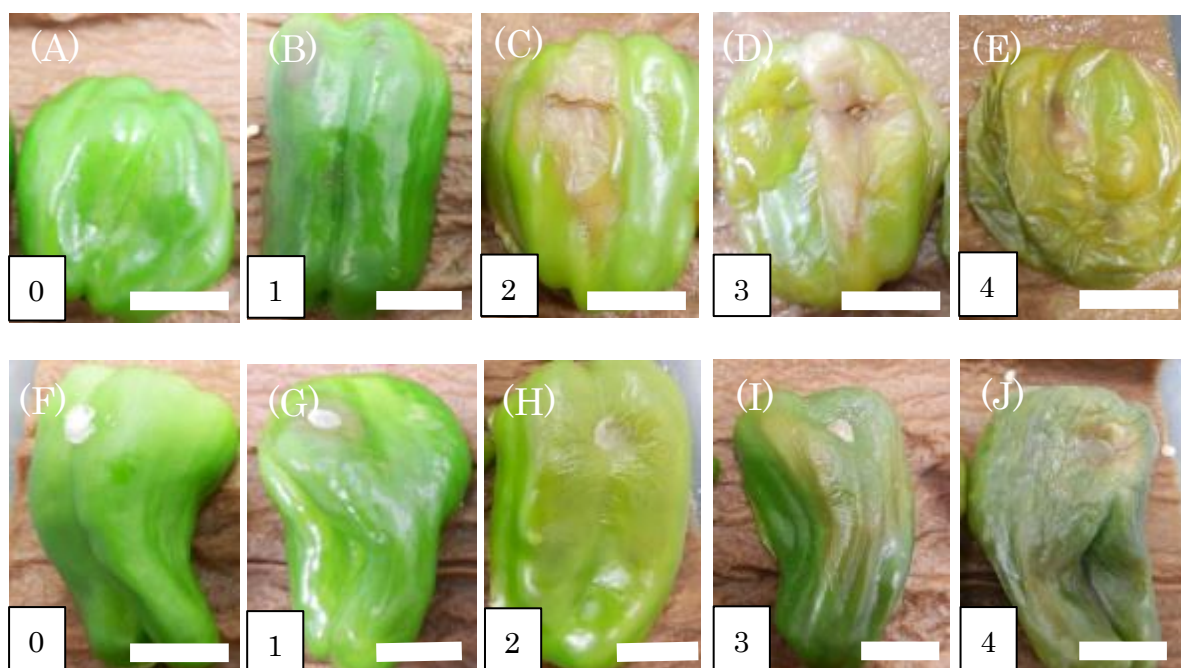


図 32. 菌類を接種したピーマンの発病程度を 5 段階で評価した写真

上段 (A) ～ (E) *Pectobacterium carotovorum*

下段 (F) ～ (J) *Phytophthora capsici*

菌類を接種したピーマン果実の発病程度を 0(病徴なし)～4(重度) とするために基準としたサンプル写真

スケールバーは 2 cm を示す。

表 6. *Pectobacterium carotovorum* に感染したピーマン果実の発病程度

度数	病徴
0	発病なし
1	傷口周辺部に病斑
2	外皮が半透明状から火ぶくれ状になる
3	果実内部が腐敗してくる
4	内部が腐敗消失して外皮を残すだけとなる

表 7. *Phytophthora capsici* に感染したピーマン果実の発病程度

度数	病徴
0	発病なし
1	接種周辺部に暗褐色の病斑
2	ピーマンの一部が軟化
3	ピーマンの半分以上が軟化
4	全体が軟化腐敗



図 33.植物病原菌を接種したピーマンとハバネロ

植物病原菌を接種し細菌では 3 日後に真菌では 4 日後に観察した写真。

(A) *Pectobacterium carotovorum* 10^7 cfu/mL (細菌) 4 日後

(B) *Phytophthora capsici* (真菌) 4 日後

(C) *Botrytis cinerea* (真菌) 4 日後

(D) *Pythium splendens* (真菌) 4 日後

写真左が市販のピーマン、右がハバネロ

スケールバーは 3 cm を示す。

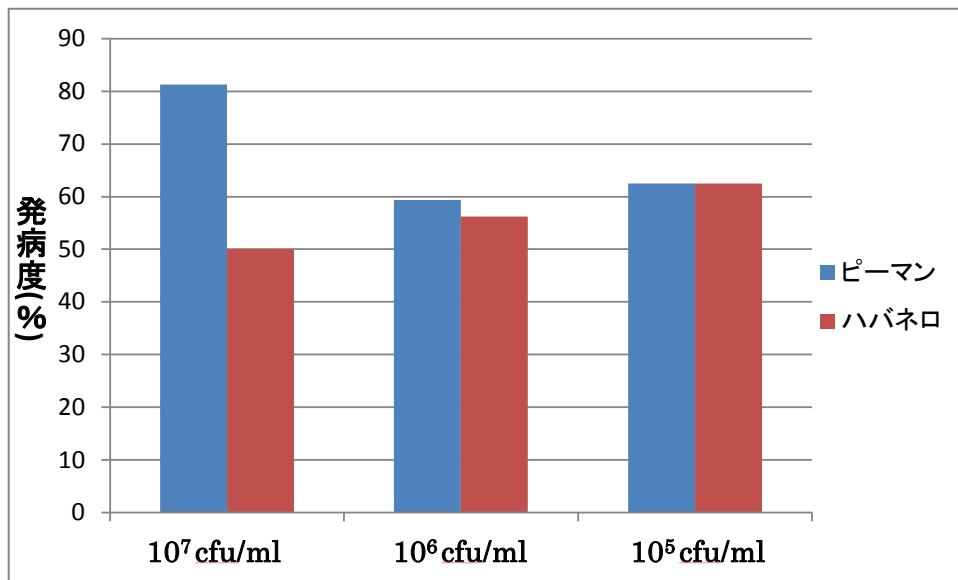


図 34：ピーマン、ハバネロへの細菌接種による発病度の比較

Pectobacterium carotovorum の噴霧接種した発病度をグラフ化したもの。噴霧接種の菌濃度は、原液を 10^8 cfu/ml とした。発病程度を 0（発病なし）～4（重度）とし、接種後 4 日後に観察したものの発病度をグラフ化した。

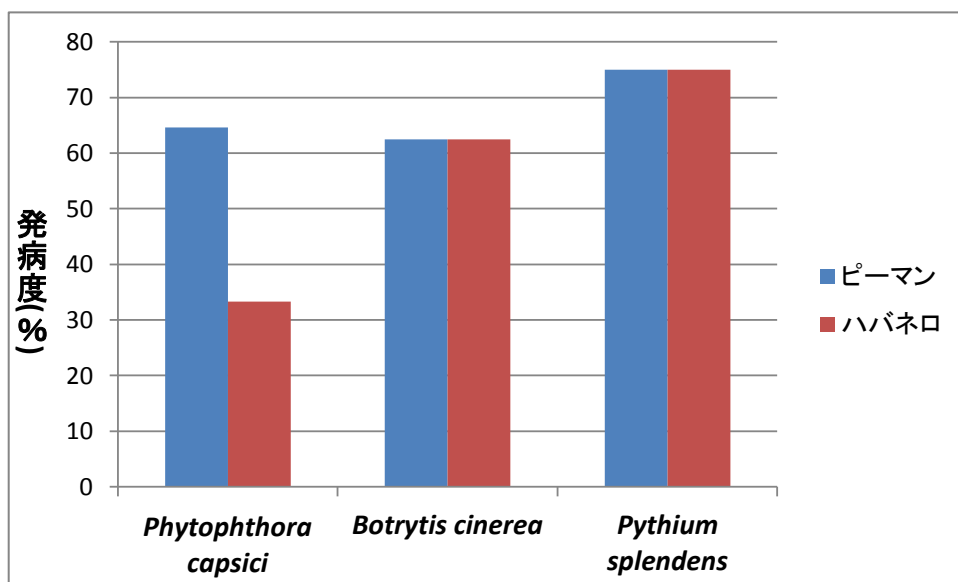


図 35：ピーマン、ハバネロへの真菌接種による発病度の比較

真菌類の貼り付け接種し病徴度をグラフ化したもの。発病程度を 0（発病なし）～4（重度）とし、接種後 4 日目に観察したものの発病度をグラフ化した。

実験 4 ②タカノツメが示す植物病原菌抑制効果の検証

実験 4 の①で、辛みのあるハバネロ果実と市販されている辛みのないピーマン果実を使用し、実際に植物に菌類を接種することでカプサイシノイドの違いによる発病程度を比較した。次に果実 1 つあたりの辛味が少ないタカノツメ果実にも同様に菌類を接種することでカプサイシノイドの違いによる病徴程度を比較した (図 36)。今回タカノツメ果実に接種した菌は実験 4①で発病程度に差がでた *Phytophthora capsici* を使用した。

Phytophthora capsici を接種したタカノツメ果実を 4 日後に観察したところ、ほとんど病徴が確認できず、発病程度を付けられるほどの感染が確認できなかった (図 37)。この結果に関しては、タカノツメはハバネロに比べ果実の大きさ自体が小さく観察には不向きであったのではないかと考えている。しかし今回の実験だけではタカノツメで病徴が確認できなかった理由を断定することはできず、タカノツメがハバネロと比べ耐病性が高い可能性や、トウガラシ果実に含まれるカプサイシノイドの局在の仕方がハバネロとタカノツメで異なるため病徴が確認出来なかった可能性等も示唆できる。

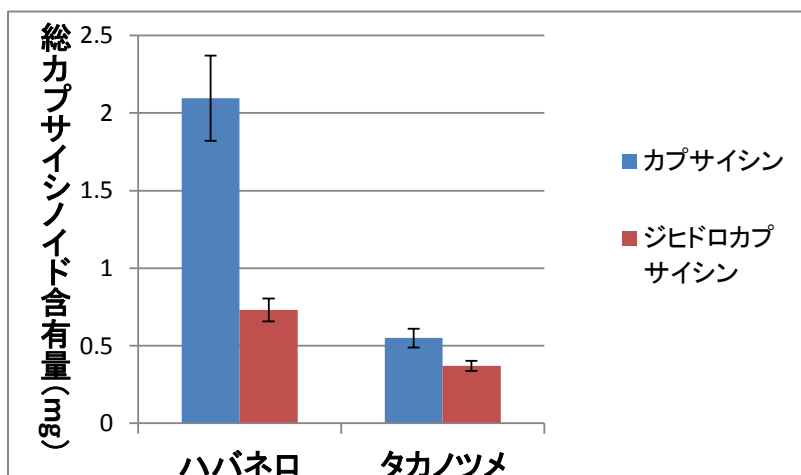


図 36. ハバネロとタカノツメに含まれる総カプサイシノイド含有量の比較。

収穫したハバネロとタカノツメのカプサイシノイドを HPLC により測定し、含有量を計算したグラフ

値は回収したハバネロ (17 個) と市販のピーマン (85 個) から得られた平均値と標準誤差を表す。



図 37. *Pectobacterium carotovorum* を接種したピーマンとタカノツメ

Pectobacterium carotovorum を接種し 4 日後に観察した写真。

(A) ピーマン (B) タカノツメ

スケールバーは 3 cm を示す。

5. 結果（まとめ）

2014年には101個、2015年には85個のタカノツメ果実が収穫できた。果実1つあたりのカプサイシン、ジヒドロカプサイシン含有量ともに、開花後30日～40日までは胎座生重量と比例するように増加し、それ以降は減少傾向にあったが、開花後90日の古い果実でもカプサイシン含有量が多い果実も存在した。それらの果実のカプサイシノイド合成部位を調べるためカプサイシノイド合成遺伝子の1つ、*Kas* 遺伝子の果肉に対する胎座における発現量変化を調べたところ、開花後30日での発現量比が最も高くその後低下した。

カプサイシノイドの抗菌効果を培地上での菌培養にて調べたところ、用いた4種類の細菌ではカプサイシノイド添加培地の増殖阻止円はハイグロマイシン添加培地よりは小さかったが、菌水添加培地のそれらよりも大きかった。しかし、顕著な違いは観察できなかった。一方真菌では、*Phytophthora capsici* と *Pythium splendens* の菌糸伸長がハイグロマイシン添加培地ほどではないが、エタノール添加培地と比べて2分の1程度に抑制された。そこで開花後40日程度の辛味の強いハバネロと、市販のピーマン果実にそれぞれに菌類を接種した。あらかじめハバネロ果実にはタカノツメ果実の3倍程度のカプサイシンが含まれて、ピーマン果実ではほとんど検出できないことを確認した。植物病原菌を接種したもののうち、細菌では *Pectobacterium carotovorum*、真菌では *Phytophthora capsici*、*Botrytis cinerea*、*Pythium splendens* に感染した。

細菌類接種ではハバネロ果実でもピーマン果実と同等の病徴を生じたが、真菌類である *Phytophthora capsici* によるハバネロ果実の発病度はピーマン果実の発病度と比べ半分程度に抑えられた。

発病度に顕著な違いがでた *Phytophthora capsici* をタカノツメ果実に接種し観察したところ、ほとんど病徴が確認できず、発病度を付けられるほどの感染が確認できなかった。

6. 考察

実験 1 よりタカノツメの果実において胎座生重量は開花後 40 日～50 日にかけて増加しそれ以降は減少した。また果実に含まれるカプサイシノイド含有量も胎座重量と比例するように開花後 30 日～40 日まで増加し、それ以降は減少傾向にあった。また実験 2 において果肉に対する胎座での *Kas* 遺伝子発現量比も開花後 30 日で増加したことから、カプサイシノイドは開花後 30 日～40 日ごろ胎座の成長と同時に胎座で大量に合成され、その後果肉や種子へと移動することが裏付けられる。しかし、開花後 90 日の胎座においてカプサイシノイド含有量が増えるものがある。また葉に対する胎座や果肉での *Kas* 遺伝子発現量は 60 日や 70 日で増加していることから一部の胎座は生重量が減少しているのにも関わらずカプサイシノイドを合成し続けている可能性や、再合成する可能性も示唆できる。開花後 90 日のカプサイシノイドがどこで合成されているのかについては今回の実験からは判断することができなかった。

実験 3、実験 4 におけるカプサイシノイドが示す抗菌性効果の検証実験から、カプサイシノイドは細菌より真菌に対して抗菌効果が強いと思われる。

実験 3 の培地実験では、細菌での阻止円の直径はカプサイシノイドの有無による差があまりなかった。また実験 4 における接種試験でもカプサイシノイドの有無に関するハバネロと市販のピーマンの果実による病徴の違いがほとんど確認されなかった。

一方真菌に関しては、植物病原菌によって多少の差はあるものの、カプサイシノイド添加培地で真菌の生育が阻害された。またハバネロへの接種試験では *Phytophthora capsici* でハバネロとピーマンで発病程度に大きな違いが見られたことから、一部の真菌に対してカプサイシノイドは抗菌効果があるのではないかと考えられる。しかし、なぜ一部の真菌では植物病原菌が抑えられるのかや、植物病原菌のどこの部分にカプサイシノイドが効いているのかなどは今回の実験から判断することが出来なかった。

7. 今後の展望

今回の実験ではトウガラシに含まれる辛み成分の開花後日数による変化の仕方や、カプサイシノイドがどの程度植物病原菌に対して抗菌効果を示すのかということについて考察するに至った。

しかし、開花後 90 日の果実でカプサイシノイド含有量が増加する理由はわからなかったため、開花後日数後期に果実でカプサイシノイドが合成されていることの証明と、合成部位について検証したいと考えている。

また、カプサイシノイドが植物病原菌のどこの部分に影響を与え抗菌性が示されるのかはわからなかったため、受容体などの有無について研究することでカプサイシノイドの抗菌効果をより高めることにつながるのではないかと期待している。

今回の実験ではカプサイシノイドの抗菌効果は検証することができたが、すべての菌類で高い抗菌効果を示すことができず、すぐに実用化できるほど強い抗菌効果は確認する事が出来なかった。今後、細菌と真菌へのカプサイシノイド抗菌効果について深く解明することでトウガラシの農業や食品保存への利用価値等を高めたい。

8. 謝辞

本研究を行うにあたり、トウガラシの育成方法をご指導して頂いた法政大学兼任講師 永吉秀光様に御礼申し上げます。

本論文の執筆、実験手法、実験内容について丁寧なご指導を頂きました法政大学 生命科学部 応用植物科学科 佐野俊夫教授、同大学兼任講師 清水隆博士に厚く御礼申し上げます。

また、トウガラシ収穫等の実験作業に協力していただいた応用植物医科学科の皆様に御礼申し上げます。

9. 引用・参考文献

- 【1】江崎グリコ株式会社 HP
(<http://www.glico.co.jp/info/chili/chili3.html>)
- 【2】岩井和夫、渡辺達夫 編 (2008) トウガラシ 辛味の科学 辛書房
- 【3】南 峰夫、豊田 美和子、井上 匡、根元 和洋、氏原 輝男 (1998) トウガラシ (*Capsicum* spp.) 果実の辛味成分含量の経時的変化 信州大学農学部紀要 第35巻第1号 P.45-49
- 【4】小菅 貞良、稲垣 幸男 (1962) 蕃椒辛味成分に関する研究 (第11報) 二辛味成分の定量と含量 日本農芸化学会誌Volume 36, No. 3, P.251-254
- 【5】Fujiwaka H., Suzuki T. and Iwai K. (1980) Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. Plant and Cell Physiology, Volume 2, P.1023-1030
- 【6】文部科学省 五訂増補日本食品標準成分表
- 【7】森一雄、澤田玄道、西浦康雄 (1976) 唐辛子辛味成分の定量法 日本食品科学工学会誌 第23巻 第5号 P.199-205
- 【8】Caterina MJ., Schumacherk MA., Tominagak M., Rosen TA ., Levine JD. and Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature, Volume 389, P.816-824
- 【9】Clapham DE., Runnels LW. and Strübing C. (2001) The trp ion channel family. Nature Reviews Neuroscience, Volume 2, P.387-396
- 【10】株式会社わかさ生活 HP
(<http://www.wakasanohimitsu.jp/seibun/red-pepper/>)
- 【11】Kawabata F., Inoue N., Yazawa S., Kawada T., Inoue K. and Fushiki T. (2006) Effects of CH-19 sweet, a non-pungent cultivar of red pepper, in decreasing the body weight and suppressing body fat accumulation by sympathetic nerve activation in humans. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, Volume 70, P.2824-2835.
- 【12】Abdou IA., Abou-Zeid AA., El-Sherbeeney MR. and Abou-El-Gheat ZH. (1972) Antimicrobial activities of allium sativum, allium cepa, raphanus sativus, *Capsicum frutescens*, Eruca sativa, Allium kurrat on bacteria. Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles, Volume 22, Issue 1, P. 29-35
- 【13】Tewksbury JJ., Reagan KM., Machnicki NJ., Carlo TA., Haak DC., Peñaloza AL. and Levey DJ. (2008) Evolutionary ecology of pungency in wild chilies Proceedings of the National Academy of Sciences, Volume 105, no. 33, P.11808-11811

- 【14】 つる新種苗 HP
(<https://www.mcci.or.jp/www/tsurusin/>)
- 【15】 原色野菜病虫害百科 トマト・ナス・ピーマン他 社会法人 農山漁村文化協会
- 【16】 田中 義行 (2015) トウガラシの辛味成分に関する遺伝育種 特産種苗 第20号 P.13-17
- 【17】Curry J., Aluru M., Mendoza M., Nevarez J., Melendrez M., and O'Connell MA. (1999) Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent Capsicum spp. Plant Science, Volume 148, P. 47-57
- 【18】 杉山 立志、志手 真人、辰尾 良秋 (2006) カプサイシン含有率と隔壁表面積計測によるトウガラシ果実におけるカプサイシン生合成能の評価 日本植物形態学会誌 18巻1号 P.75-82